



**Daniel Luís Abreu
Fernandes**

**Nariz electrónico para aplicações ambientais,
alimentares e clínicas**



**Daniel Luís Abreu
Fernandes**

**Nariz electrónico para aplicações ambientais,
alimentares e clínicas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da FCT e do FSE no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio (Bolsa de Doutoramento SFRH/BD/24680/2005).

o júri

presidente

Professor Doutor João Pedro Paiva de Oliveira
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Armando da Costa Duarte
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Alberto António Caria Canelas Pais
Professor Associado com agregação da Universidade de Coimbra

Professor Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira
Professor Associado da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes
Professora Associada da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Helena Figueiredo Godinho
Professora Auxiliar com agregação Universidade Nova de Lisboa

agradecimentos

Este trabalho deve muito a algumas pessoas, por diferentes razões, e gostaria de deixar aqui os meus agradecimentos a todas elas que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização desta Tese de Doutoramento.

Em primeiro lugar, à minha supervisora Professora Doutora Maria Teresa Gomes pela oportunidade do desenvolvimento deste tema de investigação e pelo desafio que ele representa, bem como pela disponibilidade sempre mostrada e pela sua forma exigente, crítica e criativa de arguir as ideias ao longo deste trabalho.

Ao Professor Doutor João Oliveira pelos seus preciosos ensinamentos em electrónica e quimiometria, pelos excelentes “exercícios” matemáticos apresentados ao longo dos anos, bem como pelas suas qualidades humanas e científicas e todo o inestimável auxílio prestado.

À Dra Teresa Caldeira, ao senhor Ivo Mateus, ao senhor António Morais e ao senhor Cândido Casqueira por todas as peças, reagentes ou equipamentos que disponibilizaram ou construíram, que sem eles não teria sido possível levar o trabalho a bom termo.

À Marta Veríssimo que tive a oportunidade de conhecer aqui no laboratório pela sua ajuda prestada e pelos conhecimentos dados na utilização e manuseamento das microbalanças de cristais de quartzo.

Ao Doutor Tony Rolo do Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial da FMUC pela sua paciência e grande ajuda na selecção de pacientes com problemas periodontais.

Ao Professor Doutor Carlos Silva pelo seu apoio e ajuda na resolução de alguns problemas técnicos e tecnológicos essenciais para a análise de amostras de ar expirado.

Quero destacar ainda três pessoas muito especiais para mim com um agradecimento particular, a Cláudia Lopes, a Olga Filipe e a Patrícia Rodrigues da Silva, pela ajuda e incentivo prestados, que muito me encorajaram na realização deste trabalho, mas especialmente pelo companheirismo e por todos os momentos inesquecíveis passados dentro e fora do laboratório.

Gostaria também de agradecer a todos aqueles que não constam acima mas que me apoiaram nesta etapa da minha vida, quer sejam amigos, professores ou família.

palavras-chave

Sensores de onda acústica, microbalanças de cristais de quartzo piezoelétricos, nariz electrónico, redes neuronais artificiais, compostos voláteis, fruta.

resumo

Com o presente trabalho, pretendeu-se, desenvolver um nariz electrónico, composto por uma bateria de sensores piezoelétricos, capaz de detectar e quantificar diversos compostos, ou pelo menos distinguir padrões de sinais. Este nariz, após selecção dos revestimentos dos sensores mais adequados à aplicação a que se destina, ainda que sejam todos eles não específicos e capazes de se adequarem a diversos tipos de trabalhos, foi utilizado em aplicação em áreas tão distintas como na área ambiental, alimentar, ou clínica. Para além da selecção dos revestimentos dos cristais piezoelétricos, foi feito um grande esforço na optimização do sistema de aquisição (osciladores e software) para permitir a leitura da frequência de vários sensores em simultâneo e o armazenamento em intervalos de um segundo com uma resolução de 0,1 Hz.

A utilização das redes neuronais artificiais em conjunto com a bateria de sensores permitiu desenvolver um nariz electrónico com a capacidade de identificar e quantificar o composto volátil acidentalmente libertado numa sala com $3 \times 3 \times 2,5 \text{ m}^3$, aquando da quebra de um frasco de 2,5 L. O sistema desenvolvido permitiu uma rápida e correcta identificação do contaminante de entre um conjunto de dez compostos, bem como a sua quantificação.

O nariz electrónico composto por uma bateria de sensores, onde alguns sensores foram substituídos por outros com revestimentos diferentes, aliado a um método de classificação baseado no teorema de Bayes permitiu a classificação de fruta de cinco variedades diferentes, em fruta comestível ou fruta estragada. Esta distinção apresentou uma taxa de sucesso de 95% e, no caso da fruta ser separada por variedades chegou a apresentar, para algumas variedades de fruta, taxas de sucesso de 100%.

O sensor revestido com TEA, em conjunto com algumas metodologias analíticas de pré-concentração e de eliminação de interferentes, tornou possível a análise de H_2S no hálito. Com este sistema obteve-se um limite de detecção de 50 ppb para o H_2S e foi possível distinguir pacientes saudáveis de pacientes com problemas periodontais.

keywords

Acoustic wave sensor, piezoelectric quartz crystal, electronic nose, artificial neural network, volatile compounds, fruit.

abstract

The aim of this work was to develop an electronic nose, based on piezoelectric quartz crystals, to detect and quantify several compounds, or at least to distinguish signal patterns. After selection of the most appropriate coatings, this electronic nose was used in such distinct areas as environmental monitoring, food safety and clinical diagnosis.

Besides coating selection, the greatest effort was devoted to the optimization of the frequency acquisition system. Oscillators have been changed and new software has been written in order to monitor and store simultaneously the frequency of several sensors with 0.1 Hz of resolution, and at intervals of 1 second.

The combination of the array of sensors with an artificial neural network allowed developing an electronic nose capable of identifying and quantifying the gaseous compound accidentally released in a storage room 3x3x2.5 m³ after the accidental breaking of a 2.5 L flask. The developed system allowed a quick and accurate identification of one compound out of 10, as well as its quantification.

The same electronic nose, with a few changes in sensors coatings, combined with a classification method based on Bayes theorem succeeded in classifying fruits from five different varieties in edible or rotten. Without forming fruit variety subsets, discrimination between edible and rotten fruit was achieved with 95 % success. Analysing a single variety of fruit, classification in edible and rotten fruit was achieved with 100 % success for most varieties.

An analytical system composed of a sensor coated with TEA a preconcentration column and a few traps and analytical procedures devoted to the elimination of interfering compounds, made possible H₂S analysis in breath. Detection limits as low as 50 ppb allowed to distinguish between healthy individuals and patients with periodontal disease.

NOMENCLATURA

A: área da superfície activa
 ANN: redes neuronais artificiais
 b: "bias"
 Dithiol: 1,10-decanoditiol
 F: frequência
 $f_{\text{máx}}$: frequência à impedância máxima
 f_{min} : frequência à impedância mínima
 f_p : frequência de ressonância em paralelo
 f_s : frequência de ressonância em série
 Kynar: poli(flureto de vinilideno)
 LD: limite de detecção
 M: massa
 Mg_pht: ftalocianina de magnésio (II)
 Mn_pht: ftalocianina de manganésio (II)
 Nafion: Nafion 117
 PCA: análise de componentes principais
 PCs: componentes principais
 PDMS: poli(dimetilsiloxano)
 QCM: microbalança de cristais de quartzo
 RCL: resistência, capacidade, indutância
 t: espessura
 TEA: trietanolamina
 Tenax: Tenax TA 80/100
 TMAF: flureto de tertrametilamónio tetrahidratado
 TWA (Time-Weighted Average): valor médio de exposição no período de oito horas
 VOCs: compostos orgânicos voláteis
 V_{tr} : velocidade de propagação da onda transversal ao plano do cristal
 w: peso
 ΔF : variação de frequência
 ΔM : variação da massa
 Δt : variação da espessura
 ρ_q : densidade do quartzo

ÍNDICE

NOMENCLATURA	VII
ÍNDICE	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XXI
ÍNDICE DE TABELAS	XXVII
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. SENSOR ACÚSTICO	7
2.1. INTRODUÇÃO	9
2.2. CONCEITOS FUNDAMENTAIS	9
2.3. SENSOR DE MASSA.....	13
2.4. MÉTODO ACTIVO E MÉTODO PASSIVO DE FUNCIONAMENTO DOS CRISTAIS PIEZOELÉCTRICOS E CONTAGEM DAS FREQUÊNCIAS	16
2.5. NARIZ ELECTRÓNICO E MÉTODOS DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES	20
2.6. REFERÊNCIAS	27
3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS E INSTRUMENTAÇÃO ..	29
3.1. REAGENTES	32
3.2. MÉTODOS DE APLICAÇÃO DOS REVESTIMENTOS NOS CRISTAIS PIEZOELÉCTRICOS	34
3.3. MONTAGEM EXPERIMENTAL PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS SENSORES	36
3.4. OPTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE ANÁLISE.....	38
3.4.1. <i>Optimização do oscilador</i>	40
3.4.2. <i>Software de aquisição de dados</i>	42
3.4.3. <i>Optimização da célula do sensor</i>	45
3.4.4. <i>Montagem experimental optimizada</i>	46
3.5. COMPARAÇÃO DAS MONTAGENS EXPERIMENTAIS VIDRO VS. PVC	47
3.6. BATERIA DE SENSORES DO NARIZ ELECTRÓNICO COM ARRANJO EM SÉRIE VS. EM PARALELO	49
3.7. CONCLUSÃO	52
3.8. REFERÊNCIAS	52
4 NARIZ ELECTRÓNICO PARA IDENTIFICAR E QUANTIFICAR COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	53
4.1. INTRODUÇÃO	55
4.2. SISTEMA EXPERIMENTAL.....	58
4.3. PROCEDIMENTO	58
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.5. CONCLUSÕES	76
4.6. REFERÊNCIAS	76
5. NARIZ ELECTRÓNICO PARA DETECÇÃO DE FRUTA ESTRAGADA.....	79
5.1. INTRODUÇÃO	81
5.2. SISTEMA EXPERIMENTAL.....	83
5.3. PROCEDIMENTO	84

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
5.5. CONCLUSÕES	96
5.6. REFERÊNCIAS	96
6. SISTEMA ANALÍTICO PARA AVALIAÇÃO DE HALITOSSES ORAIS	99
6.1. INTRODUÇÃO	101
6.2. SISTEMA EXPERIMENTAL	107
6.3. PROCEDIMENTO	110
6.3.1. Caracterização dos sensores	110
6.3.2. Preparação dos padrões gasosos de H_2S	111
6.3.3. Preparação das colunas de pré-concentração	111
6.3.4. Amostragem	112
6.3.5. Análise das amostras de hálito	113
6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
6.5. CONCLUSÕES	125
6.6. REFERÊNCIAS	125
7. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS PARA O FUTURO	127
ANEXOS	133
ANEXOS A	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Efeito piezoelétrico directo a) e inverso b)	11
Figura 2.2 – Circuito equivalente de um cristal piezoelétrico num oscilador	12
Figura 2.3 – Efeito piezoelétrico inverso em modo de cisalhamento ..	12
Figura 2.4 – Modelo de um neurónio artificial	23
Figura 2.5 – Esquema de uma possível rede neuronal.....	24
Figura 3.1 – Métodos de aplicação dos revestimentos nos cristais piezoelétricos: a) revestimento com micropipeta; b) revestimento por spray; c) revestimento com “spin coater”.....	35
Figura 3.2 – Sistema experimental usado para caracterizar os sensores: a) rotâmetro, b) porta de injeção, c) célula de vidro, d) oscilador, e) fonte de alimentação e f) frequencímetro.....	36
Figura 3.3 – Esquema das células de vidro usadas para caracterizar os sensores.....	37
Figura 3.4 – Circuito oscilador usado para os sensores acústicos: IC1 – 7404, IC2 – 7414, C1 – 20 pF, C2 – 0,01 μ F, R1 e R2 – 390 Ω	38
Figura 3.5 – Circuito divisor do sinal do oscilador com o semiconductor CMOS 74HC292.....	41
Figura 3.6 – Circuito regulador de voltagem.	42
Figura 3.7 – Parte do programa de aquisição.	43
Figura 3.8 – Painel frontal do programa de aquisição.....	44
Figura 3.9 – Célula em PVC de volume reduzido.	46
Figura 3.10 – Sistema experimental com células de PVC e com sistema de aquisição PXI-6608. a) rotâmetro; b) porta de injeção; c) célula de PVC; d) oscilador com circuito divisor; e) fonte de alimentação; f) aquisição PXI-6608 acoplada a um computador.....	47
Figura 3.11 – Resultados obtidos com os dois sistemas experimentais, célula de vidro e célula de PVC, para diferentes quantidades de NH_3 , usando o sensor revestido com ftalocianina de Mg(II).	48

Figura 3.12 – Sistema de aquisição para vários sensores dispostos em série: a) rotâmetro; b) porta de injeção; c) células; d) osciladores; e) fonte de alimentação dos osciladores; f) painel BNC 2121; g) Counter/Timer PXI-6608; h) computador.	50
Figura 3.13 – Sistema de aquisição para vários sensores dispostos em paralelo: a) rotâmetro; b) porta de injeção; c) válvula de distribuição; d) células para os cristais; e) oscilador; f) fonte de alimentação; g) painel BNC 2121; h) Counter/Timer PXI-6608; i) computador.	51
Figura 4.1 – Frasco usado para a obtenção das amostras gasosas com concentração conhecida.....	59
Figura 4.2 – Variações de frequência obtidas na bateria de sensores do sistema de análise quando foi injectada uma amostra de metanol.	61
Figura 4.3 – Gráfico radial com as “impressões digitais” normalizadas que se obtiveram com a bateria de sensores para cada um dos compostos.	64
Figura 4.4 – Representação dos dados através dos três primeiros componentes principais.	68
Figura 4.5 – Representação dos dados normalizados através dos três primeiros componentes principais.	72
Figura 5.1 – Sistema experimental: a) rotâmetro; b) porta de injeção; c) serpentina para acomodar as amostras; d) válvula de distribuição; e) célula para o cristal; f) oscilador; g) fonte de alimentação; h) contador PXI-6608; i) computador; j) saco de amostragem com septo.	84
Figura 5.2 – Saco de amostragem das peças de fruta.	85
Figura 5.3 – Gráfico radial com os padrões obtidos para as cinco variedades de fruta comestíveis e estragadas analisadas com a bateria de sensores.....	88
Figura 5.4 – Variações de frequência obtidas no sistema de análise com a injeção de duas amostras de fruta, Pêra William estragada e Laranjas New Hall estragada.	89

Figura 5.5 – Representação gráfica das amostras para cada variedade de fruta e para todo o conjunto das frutas analisadas através dos sensores 2 e 5, e as respectivas funções discriminantes obtidas. (● fruta comestível, ○ fruta estragada)	93
Figura 5.6 – Representação gráfica dos dados das maçãs Starking obtidos através dos sensores 4 e 6, e a respectiva função discriminante. (● fruta comestível, ○ fruta estragada).....	95
Figura 6.1 – Compostos mais relevantes encontrados no hálito e a sua proveniência.	104
Figura 6.2 – Sistema experimental com células de PVC e com unidade de pré-concentração para a análise do H_2S no ar expirado: a) rotâmetro, b) unidade de pré-concentração, c) membrana de Nafion, d) célula de PVC, e) fonte de alimentação, f) oscilador com circuito divisor, g) computador com sistema de aquisição PXI-6608.....	108
Figura 6.3 – Sistema de injeção e unidade de pré-concentração com indicação da direcção dos gases nos vários passos da análise: a) pré-concentração, b) dessorção e análise, c) eliminação da água e regeneração da coluna.	109
Figura 6.4 – Sistema de amostragem: a) saco de amostragem de Tedlar, b) copo contendo a mistura frigorífica, c) bocal de polietileno.	110
Figura 6.5 – Coeficientes de selectividade obtidos para os diferentes compostos encontrados no ar expirado.	116
Figura 6.6 – Frequência do sensor TEA obtido para três injeções de padrões diferentes no sistema de análise acoplado a uma coluna de pré-concentração com o peneiro molecular MS-5A.	118
Figura 6.7 – Sinal obtido com o sistema de aquisição com membranas secantes de Nafion e coluna de carvão activado, para uma amostra contendo H_2S , CO_2 e vapor de água.	121

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Erros obtidos na determinação da frequência de dois sinais através da determinação dos seus períodos com um sinal de frequência conhecido.	18
Tabela 2.2 – Erros obtidos na determinação de um sinal de 8 MHz com uma “timebase” de 80 MHz, utilizando um dos contadores para dividir o sinal desconhecido num submúltiplo de baixa frequência.	20
Tabela 3.1 – Limites de detecção para o NH ₃ obtidos nos dois sistemas experimentais, célula de vidro e célula de PVC, com o sensor revestido com ftalocianina de Mg(II).	49
Tabela 4.1 – Resultados obtidos na validação da rede neuronal artificial com o grupo de teste. Compostos e quantidades injectadas vs. Resultados obtidos pela rede neuronal artificial.	66
Tabela 4.2 Coeficientes de correlação obtidos entre os seis sensores da bateria utilizada no nariz electrónico.....	67
Tabela 4.3 – Resultados obtidos na validação da rede neuronal artificial com o grupo de teste. Compostos e quantidades injectadas vs. Resultados obtidos pela rede neuronal artificial.	69
Tabela 4.4 – Vectores próprios determinados a partir dos dados das amostras dos seis sensores e a variância total explicada por cada vector.	70
Tabela 4.5 – Coeficientes de correlação obtidos entre os sensores com os dados normalizados.....	71
Tabela 4.6 – Vectores próprios obtidos a partir dos dados normalizados e a variância total explicada por cada vector.....	73
Tabela 4.7 – Resultados obtidos na validação da rede neuronal com o grupo de teste. Compostos injectados vs. Composto identificado pela rede neuronal artificial.	74
Tabela 4.8 – Rectas de calibração obtidas com os sensores mais sensíveis para cada composto testado.	75

Tabela 5.1 – Coeficientes de correlação entre os sensores da bateria utilizada na análise.	91
Tabela 6.1 – Classificação das Halitoses.....	103
Tabela 6.2 – Limites de detecção para o H ₂ S obtidos para os diferentes sensores.....	115
Tabela 6.3 – Resultados obtidos no sistema desenvolvido e o diagnóstico clínico dos pacientes.	123

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

A análise química de amostras em concentrações cada vez menores com elevada precisão e exactidão tornou-se num dos principais objectivos em diversas áreas como na alimentar, ambiental, clínica e na indústria. A necessidade de novos métodos de análise cada vez mais rápidos e de baixo custo, tem levado ao desenvolvimento de equipamentos analíticos versáteis e de fácil manipulação, o que conduziu a um crescente desenvolvimento de sensores químicos. Estes sensores e os métodos de análise devem ser robustos e se possível controlados ou assistidos por computador [1, 4].

Os sensores químicos são dispositivos constituídos por uma componente sensível ao analito e por um transdutor que converte uma informação química num sinal eléctrico mensurável [1, 2]. A informação química engloba variações de concentrações, pressões de vapor, moléculas, ou iões, em diferentes meios, gasosos, líquidos ou sólidos [2].

Dentro da grande variedade de sensores químicos temos os sensores de massa baseados em cristais piezoeléctricos de quartzo, e foram estes os escolhidos para o desenvolvimento deste trabalho. Basicamente um sensor de massa é constituído por um transdutor, cristal piezoeléctrico, e por um filme sensível ao composto a detectar. Este transdutor transforma uma variação de

massa num sinal eléctrico, que neste caso é uma variação da frequência [3, 5].

Estes dispositivos foram escolhidos para este trabalho devido a uma série de características como a sua elevada sensibilidade, a robustez, o baixo custo, a facilidade de manuseamento e utilização, e a possibilidade de serem incorporados em aparelhos portáteis para medição *in situ* e em tempo real. Estas características tornam este tipo de sensores adequados para uma grande variedade de aplicações [3, 4, 5].

No presente trabalho, pretendeu-se desenvolver sensores para a detecção de diferentes compostos voláteis, baseados em cristais de quartzo piezoeléctricos. Em algumas aplicações, os limites de detecção necessários eram muito mais baixos do que os que se conseguiam com os sensores e foi necessário montar sistemas de análise que incluíam uma coluna de pré-concentração. Esta mesma coluna tinha ainda como função eliminar alguns interferentes, tendo-se recorrido ainda à utilização de membranas e colunas de secagem para eliminação do vapor de água. O sistema de análise mostrou ser capaz de detectar e quantificar o H_2S no ar expirado, podendo ser útil como método de avaliação de halitoses orais em pacientes com doença periodontal.

Alguns dos sensores desenvolvidos foram ainda combinados numa bateria, a fim de se detectar e quantificar um conjunto de compostos voláteis. A grande vantagem em utilizar uma bateria de sensores em vez dos sensores individuais reside na diminuição da exigência quanto à selectividade dos sensores individuais, à custa de um maior esforço computacional no tratamento matemático do conjunto dos resultados.

Estes narizes electrónicos foram capazes de, com um número de sensores inferior ao número de compostos, detectar e quantificar os compostos voláteis, ou pelo menos distinguir padrões de sinais. O nariz electrónico foi aplicado com sucesso na análise do ar e na avaliação de alimentos. Mais concretamente, desenvolveu-se um nariz electrónico para

identificar e quantificar o composto volátil derramado acidentalmente num armazém de produtos químicos, passível de ser utilizado num sistema de alarme, e um segundo nariz, semelhante ao anterior, para ser utilizado na detecção de fruta estragada numa despensa.

2. SENSOR ACÚSTICO

2. SENSOR ACÚSTICO

2.1. Introdução

Neste trabalho vamos usar cristais piezoelétricos de quartzo como base para a construção dos sensores. Por esta razão neste capítulo vamos tratar dos conceitos teóricos da piezoelectricidade, dos fundamentos básicos destes dispositivos como sensor de massa, dos métodos de funcionamento e de determinação das frequências, a sua aplicação em baterias de sensores em narizes electrónicos e de alguns métodos de reconhecimento de padrões utilizados para o tratamento dos dados.

2.2. Conceitos fundamentais

A piezoelectricidade é uma característica de certos materiais e foi descoberta pelos irmãos Pierre e Jacques Curie em 1880. Eles verificaram que determinados cristais como sais de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio), cristais de quartzo, turmalina, entre outros, produzem uma diferença de potencial quando sujeitos a uma pressão aplicada em determinadas direcções cristalográficas [3, 6-8]. A carga eléctrica que se produz à superfície do cristal é proporcional à pressão exercida, e deve-se a um rearranjo da estrutura cristalina que provoca uma alteração na distribuição

da carga, e desaparece com o término da pressão aplicada. Este fenómeno é denominado efeito piezoelétrico directo [8, 10]. Em 1881, Lippmann baseando-se nos princípios fundamentais da termodinâmica deduziu a existência do efeito inverso, ou seja, a ocorrência de uma deformação mecânica do cristal com a aplicação de um campo eléctrico. Nesse mesmo ano os irmãos Curie confirmaram experimentalmente este efeito inverso e comprovaram a completa reversibilidade das deformações mecânico-electro-elásticas nos materiais piezoeléctricos [6, 7].

Inicialmente a piezoelectricidade não suscitou grande interesse devido à sua complexidade e dificuldade de compreensão deste fenómeno. Só mais tarde, devido à necessidade de novos equipamentos para a primeira e segunda Guerras Mundiais, o efeito piezoeléctrico foi utilizado para o fabrico de sonares e outros aparelhos electrónicos [3].

Os materiais piezoeléctricos são compostos inorgânicos e distinguem-se dos restantes sólidos por possuírem uma estrutura interna ordenada. Os materiais inorgânicos podem ser subdivididos em três categorias, os vidros, os cristais únicos e as cerâmicas. Destas três classes os vidros apresentam uma natureza amorfa, e por isso não apresentam propriedades piezoeléctricas. Nas outras duas classes, os cristais únicos e as cerâmicas, existem alguns materiais que quando polarizados apresentam propriedades piezoeléctricas, e deve-se a certas características intrínsecas do material, nomeadamente a sua estrutura interna ordenada [3, 8].

Estes materiais cristalinos a nível da sua estrutura cristalográfica podem ser classificados em 32 classes de acordo com os seus elementos de simetria. Destas classes, 21 não possuem centro de simetria. Esta é uma das condições obrigatórias para a existência de piezoelectricidade [3, 8]. Assim a aplicação de uma pressão num material anisotrópico leva à distribuição assimétrica das cargas, gerando-se assim uma polarização eléctrica (dipolo) – processo chamado de efeito piezoeléctrico directo. Em materiais simétricos após a aplicação de uma força o momento de dipolar seria nulo [3, 8].

O efeito contrário também se verifica, aplicando um campo eléctrico nas faces do cristal, este provoca uma deformação mecânica no cristal, e denomina-se efeito piezoeléctrico inverso [3, 4, 8]. Na figura 2.1 encontram-se esquematizados estes fenómenos electromecânicos.

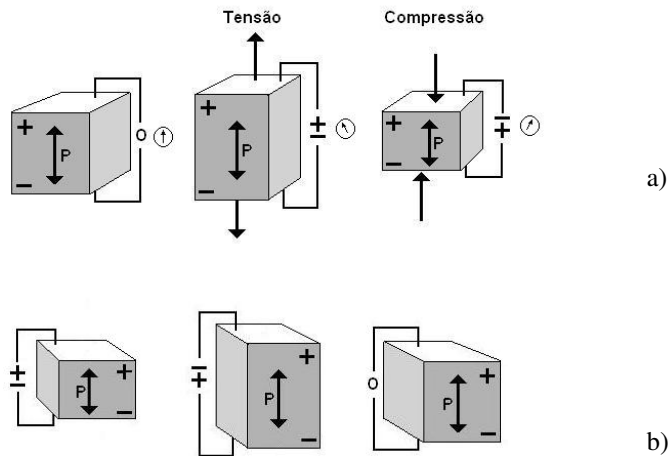


Figura 2.1 – Efeito piezoeléctrico directo a) e inverso b) [9].

A utilização dos cristais piezoelétricos em circuitos osciladores para gerar frequências estáveis foi demonstrada em 1919 por Cady. Quando a perturbação eléctrica tem as características adequadas (amplitude e frequência), este oscilará mecanicamente de um modo ressonante. O oscilador piezoeléctrico pode ser representado por um circuito eléctrico equivalente RCL ligado em paralelo a um condensador, e encontra-se esquematizado na figura 2.2 [3, 11].

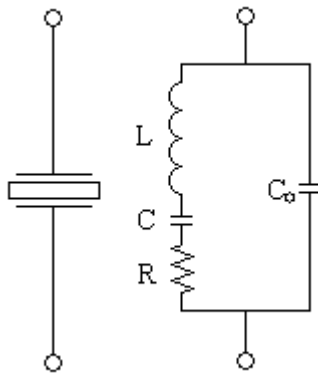


Figura 2.2 – Circuito equivalente de um cristal piezoelétrico num oscilador [8].

Apesar do desenvolvimento de novos materiais cerâmicos piezoelétricos, o quartzo devido às suas características como ser insolúvel em água, inerte, resistir termicamente até 579° C (temperatura de Curie) e de ser de ocorrência natural, foi o material piezoelétrico mais estudado. Além disso é um dos materiais que apresenta uma razão excelente entre a energia armazenada e a energia perdida por ciclo (factor de qualidade Q), o que garante a estabilidade da frequência [3].

Um cristal de quartzo pode ter muitos modos de ressonância e estes dependem do tipo de corte da lâmina do cristal. Dentro dos diferentes tipos de ressonâncias que podem existir, o modo de cisalhamento de espessura é o modo de vibração mais sensível a variações de massa [8]. Na figura 2.3 está esquematizada a oscilação de um cristal piezoelétrico em modo de cisalhamento de espessura quando se aplica um potencial eléctrico perpendicular à superfície do cristal.

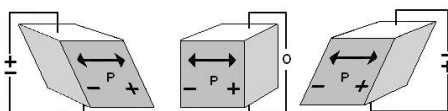


Figura 2.3 – Efeito piezoelétrico inverso em modo de cisalhamento [9].

Neste modo de cisalhamento a propagação da onda é perpendicular ao campo eléctrico e o deslocamento do cristal é paralelo ao plano da superfície [11].

2.3. Sensor de massa

Desde o início da aplicação dos cristais de quartzo em circuitos osciladores para equipamentos de radiofrequência, que se sabia do efeito da massa no controlo da frequência. Os técnicos de RF sabiam que podiam ajustar a frequência do oscilador fazendo uma marca com um lápis nos eléctrodos do cristal ou através do desgaste de parte do material dos eléctrodos [8].

O entendimento físico e matemático deste fenómeno só foi deduzido em 1959 por Sauerbrey, que mostrou que a variação da frequência de ressonância de um cristal de quartzo, é directamente proporcional à quantidade de massa adicionada. Este trabalho de Sauerbrey foi o ponto de viragem para o desenvolvimento de um novo instrumento para a medição de pequenas quantidades de massa. Surgiu assim o conceito da microbalança de cristais de quartzo (QCM) [12].

Sauerbrey verificou que, para cristais a oscilarem em modo fundamental de cisalhamento, a frequência de ressonância variava de cristal para cristal de acordo com as suas características individuais, como a espessura da lâmina do cristal e propriedades do material piezoeléctrico. A equação 2.1 mostra a relação entre a frequência de ressonância (F), com a espessura (t), e a velocidade de propagação da onda transversal ao plano do cristal (V_{tr}).

$$F_0 = \frac{V_{tr}}{2t}$$

Equação 2.1

A sensibilidade do cristal à massa depende da frequência, e esta aumenta com o quadrado da frequência fundamental, ou seja, é maior para

cristais a oscilarem em frequências maiores [13]. Como podemos ver pela equação 2.1, uma vez que V_{tr} é uma constante do material, para obter frequências altas são necessárias espessuras muito pequenas. É necessário, portanto, um compromisso entre sensibilidade e a espessura do cristal. Por este motivo, as frequências dos cristais que normalmente são utilizadas em QCM encontram-se entre 5 e 10 MHz. [11]. Frequências maiores que 15 MHz são raramente utilizadas em microbalanças de cristais de quartzo, devido às espessuras muito finas que tornam difícil a sua manipulação [8].

A partir da equação 2.1, Sauerbrey considerando um aumento infinitesimal na espessura, obteve a equação 2.2, que relaciona uma variação de frequência (ΔF), com a variação da espessura (Δt).

$$\frac{\Delta F}{F} = -\frac{\Delta t}{t} \quad \textbf{Equação 2.2}$$

Esta variação da espessura pode ser exclusivamente relacionada com a variação da massa (ΔM) do cristal de quartzo através da equação 2.3:

$$t = \frac{M}{A\rho_q} \quad \textbf{Equação 2.3}$$

onde M é a massa de quartzo, A é a área activa do cristal e ρ_q a massa volúmica do quartzo, vem

$$\frac{\Delta F}{F} = -\frac{\Delta M}{tA\rho_q} \quad \textbf{Equação 2.4}$$

Substituindo a espessura pela equação 2.1 e as constantes pelos seus valores, podemos escrever a equação final simplificada de Sauerbrey, a equação 2.5

$$\Delta F = -2,26 \times 10^6 F^2 \left(\frac{\Delta M}{A} \right) \quad \textbf{Equação 2.5}$$

Esta equação permite a determinação da variação de frequência (ΔF , Hz), devida a uma variação de massa (ΔM , g) no cristal e vice-versa, onde F é a frequência de ressonância fundamental do cristal de quartzo, expressa em MHz, e A é a área piezoelectricamente activa, expressa em cm^2 [2-5].

A dedução desta equação esteve na origem do conceito da microbalança de cristal de quartzo. Contudo, este modelo tem algumas limitações na sua aplicação prática. Considera que a deposição da massa se comporta de forma semelhante ao quartzo e é válida apenas para camadas finas inferiores a 2 % da quantidade de quartzo, para filmes rígidos e uniformes na área activa [10]. Estas limitações em alguns estudos impossibilitam a sua aplicação de forma quantitativa, o que obriga à utilização de curvas de calibração [4].

Este estudo levou nas décadas seguintes ao desenvolvimento de sensores acústicos com a primeira aplicação em 1964 por King [2, 8].

Um cristal piezoeléctrico sem revestimento só poderá ser utilizado como sensor de massa se o composto que se pretende detectar interagir com os eléctrodos, como a determinação de mercúrio por amalgamação ao ouro dos eléctrodos [14]. Cada cristal piezoeléctrico precisa, portanto, de ser revestido com um filme que interaja com o composto a analisar. Este revestimento deve ser cuidadosamente escolhido de forma a interagir de forma reversível, com alguma selectividade para o composto que se quer detectar e deve também ser estável num longo período de tempo [14]. A deposição do filme produz um primeiro decréscimo de frequência, o qual passa a ser a linha de base do sensor, e a interacção entre o analito e o revestimento produz um segundo decréscimo de frequência, sinal analítico, o qual é proporcional à massa adsorvida ao filme sensível do sensor. Esta interacção é regulada por certas afinidades físico-químicas entre o composto volátil e o filme sensível aplicado nos eléctrodos do cristal piezoeléctrico. A adsorção pode ser de vários tipos, desde forças de Van der Waals a ligações de hidrogénio, e depende principalmente da polaridade dos compostos, de impedimentos estéreos e da densidade electrónica- π [13, 15]. No entanto, não pode envolver ligações

covalentes, uma vez que as altas energias envolvidas tornariam o sensor irreversível.

2.4. Método activo e método passivo de funcionamento dos cristais piezoelétricos e contagem das frequências

Existem dois métodos diferentes de utilização dos cristais piezoelétricos, o método activo e o método passivo.

Em geral pretende-se que o cristal apenas oscile em modo fundamental, contudo o cristal pode vibrar em frequências múltiplas desta (harmónicos) [8].

No método activo o cristal controla a frequência do oscilador, ou seja, é parte activa do circuito. Neste caso usam-se frequencímetros e a frequência medida é geralmente frequência em série, f_s . Este é o método tradicionalmente utilizado nos sensores piezoelétricos, uma vez que é o mais simples e barato. Esta técnica é igualmente conhecida como o método do oscilador [3, 8, 13].

No segundo método, método passivo, o cristal piezoelétrico é ligado externamente a um analisador de redes. Este dispositivo gera um espectro de frequências e aplica-o aos terminais do cristal. Com este método é possível determinar outros parâmetros do cristal, para além da f_s , quando este entra em ressonância com a frequência do analisador de redes, como por exemplo a frequência de ressonância em paralelo (f_p), frequência à impedância mínima (f_{min}), frequência à impedância máxima (f_{max}), elementos do circuito equivalente e factor de qualidade (Q). No entanto, são instrumentos de utilização complexa e de custos muito elevados, o que faz deste método mais adequado como ferramenta em laboratórios do que a utilização através dos osciladores [3, 4, 13].

O erro na determinação das frequências dos cristais depende do tempo de aquisição e é menor para tempos longos. Contudo, em certos trabalhos é

necessário observar a dinâmica da variação de massa, ou pode acontecer que o processo de adsorção seja curto. Nestes casos a medição da frequência tem de ser curta, o que vai limitar a resolução na medição da frequência e consequentemente na sensibilidade na medição da massa.

Existem alguns métodos diferentes para a contagem de frequências pelo método do oscilador, sendo o mais simples através da determinação do período, que utiliza apenas um contador e é de fácil execução. O contador determina o número de impulsos da "timebase" interna do contador que ocorrem num impulso do sinal do sensor. Como o sinal da "timebase" interna é conhecido, o período do sensor é facilmente determinado por multiplicação do período da "timebase" pelo número de impulsos deste sinal que ocorreram durante um impulso do sinal do sensor. Uma vez determinado o período do sinal do sensor obtém-se a frequência pela equação $F=1/P$. No entanto, o erro na medição neste método aumenta com a aproximação da frequência do sinal à frequência utilizada como "timebase" no contador [26].

Na contagem dos impulsos da "timebase" que ocorrem durante um período do sinal externo, existe um erro de ± 1 ciclo dependendo da sincronização da onda dos dois sinais e podem ocorrer três casos na contagem do sinal do sensor (+1, 0, -1). Na tabela 2.1, está esquematizado o que acontece na determinação de dois sinais diferentes.

Supondo dois sinais externos, o primeiro de 5MHz e o segundo sinal de 50 Hz, e utilizando uma "timebase" de 20 MHz como sinal para o contador na determinação destes sinais externos, obtém-se um erro de 20% a 33% no primeiro caso e de apenas 0,00025% no sinal de 50 Hz.

Tabela 2.1 – Erros obtidos na determinação da frequência de dois sinais através da determinação dos seus períodos com um sinal de frequência conhecido.

Freq. do sensor	50 Hz		5 MHz	
(Nº de ciclos da timebase)	(400000)		(4)	
Medição com	+1 ciclo	-1 ciclo	+1 ciclo	-1 ciclo
Nº de ciclos da timebase	400001	399999	5	3
Frequência obtida	49,99988 Hz	50,00012 Hz	4 MHz	6,67 MHz

Como podemos ver na tabela 2.1, este método é apenas eficiente para medição de frequências baixas, obtém-se um erro de apenas 0,00025% para um sinal de 50 Hz, no entanto para um sinal de 5 MHz, que é apenas 4 vezes inferior ao sinal da “timebase”, o erro é extremamente elevado $\approx 30\%$. No nosso caso os sinais possuem uma frequência na ordem dos 9 MHz e a “timebase” máxima da placa de aquisição de dados PXI-6608 é de 80 MHz (9 vezes superior), o que origina erros de 11% na determinação do sinal do sensor. Para termos alguma sensibilidade no sistema pretendemos ter definição na leitura da frequência até à unidade (1 Hz). Isto é, para sinais de 9 MHz uma variação de 1 Hz implica um erro na leitura da frequência de $1 \times 10^{-5}\%$, o que significa que o método anterior não é aplicável.

O segundo método utiliza dois contadores, um para gerar um sinal de período conhecido e outro para realizar a medição do período, e já pode ser utilizado para medir frequências altas. Um dos contadores é utilizado para gerar um impulso conhecido e bastante estável, normalmente 0,1 segundos ou 1 segundo, utilizando o sinal da “timebase” interna, que neste caso é de 80 MHz. O outro contador é utilizado para contar os impulsos do sinal desconhecido do sensor nesse período de tempo (1 ou 0,1 segundos). Para determinar a frequência do sinal do sensor basta dividir o número de impulsos do sinal do sensor pelo tempo do sinal conhecido [26]. Por exemplo, se

gerarmos um impulso de 0.1 segundos com a "timebase" interna e durante este tempo ocorrerem 886486 ± 1 impulsos do sinal desconhecido, a frequência deste sinal é de 8864860 ± 10 Hz. Este método tem a desvantagem de se perder um dos oito canais para gerar o sinal de tempo, mas torna-se possível a determinação das frequências altas dos sensores com um erro de ± 1 Hz utilizando uma "timebase" de 1 segundo.

O terceiro método para determinar frequências também utiliza dois contadores, mas neste caso o contador que gera o sinal de tempo (que determina a duração da etapa de contagem), utiliza o sinal desconhecido dos sensores, enquanto o contador utilizado para determinar o período anterior usa a "timebase" interna de 80 MHz [26].

O sinal de tempo que determina a duração da contagem dos impulsos é um submúltiplo do sinal desconhecido do sensor, e tem um período de 2^n vezes o período original do sensor, em que n é um número inteiro positivo (no nosso caso $n=20$). Uma vez que este sinal provém do sinal do sensor, é um sinal de período desconhecido mas vai ser determinado pelo outro contador utilizando o sinal interno conhecido de 80 MHz, tal como no primeiro método. A vantagem é que transformamos o sinal de alta frequência em baixa frequência, permitindo assim a determinação do sinal de alta frequência com erros muito pequenos. Isto é o equivalente à determinação de 1048576 (2^{20}) períodos do sinal do sensor com o erro total de apenas ± 1 ciclo do sinal de 80 MHz, em vez de termos um erro de ± 1 ciclo do sinal da "timebase" por período do sensor. Supondo um sinal do sensor de 8000000 Hz, dividindo o sinal por um factor de 2^{20} , geramos um sinal que é um submúltiplo do original, de 7.6293945 Hz. Utilizando uma "timebase" de 80 MHz para fazer a contagem do período deste sinal teremos 10485760 impulsos com um erro de ± 1 ciclo (12.5 ns) desta "timebase". Na tabela 2.2 está esquematizado o que acontece na determinação de um sinal de 8 MHz com uma "timebase" de 80 MHz utilizando este método.

Tabela 2.2 – Erros obtidos na determinação de um sinal de 8 MHz com uma “timebase” de 80 MHz, utilizando um dos contadores para dividir o sinal desconhecido num submúltiplo de baixa frequência.

	Medição com +1 ciclo	Medição com -1 ciclo
Nº de ciclos da timebase	10485761	10485759
Frequência do sinal medido	7.6293938 Hz	7.6293953 Hz
Frequência do sinal original ($\times 2^{20}$)	7999999.2 Hz	8000000.8 Hz

Podemos observar que o erro é inferior a 1 Hz, aproximadamente 0,8 Hz, com apenas uma contagem que dura 0,13 segundos. Como tal, podemos realizar pelo menos 7 contagens por segundo e, através da média, calcular a frequência do sinal com uma melhor resolução, podendo chegar quase à décima do Hertz.

Este método introduz um menor erro na determinação de frequências altas, mas são utilizados sempre dois canais por sensor, o que nos limita a aquisição a metade dos sensores possíveis de adquirir em simultâneo por uma determinada placa contadora. Além disso, é necessário ter uma ideia aproximada do valor do sinal desconhecido, para saber o factor n a aplicar na divisão do sinal.

2.5. Nariz electrónico e métodos de reconhecimento de padrões

A especificidade de um sensor a um único composto é uma tarefa muito difícil de alcançar. Por essa razão, na maioria das vezes são desenvolvidos dispositivos utilizando um conjunto variado de sensores não-específicos, para detectar os compostos presentes nas amostras, e são utilizados em conjunto com sistemas de reconhecimento de padrões capazes de identificar os

compostos detectados [20, 25]. Estes aparelhos podem ser usados para analisar amostras gasosas ou líquidas e são correntemente designados de narizes ou línguas electrónicas, respectivamente.

Nos últimos anos, o nariz humano é um dos sentidos que se tem tentado imitar. Com a evolução de sistemas inteligentes e com o avanço de técnicas de reconhecimento de padrões em conjunto com sensores químicos, deu-se início ao desenvolvimento de narizes electrónicos [8]. De todos os sentidos humanos, o olfacto é o mais complexo e por essa razão ainda não foi desenvolvido um sistema electrónico olfactivo que permita uma perfeita reprodução do nariz humano [16].

No ser humano o olfacto é baseado na interacção entre as partículas odoríferas inaladas e os receptores olfactivos, que se encontram na cavidade nasal. Esta interacção desencadeia uma reacção química que gera um impulso nervoso, o qual é enviado pelo bolbo olfactivo para o cérebro. Este sinal é processado no córtex cerebral olfactivo, o qual, baseando-se em padrões neuronais de experiências anteriores, identifica o odor. Finalmente, é necessário inspirar ar fresco, para remover as moléculas odoríferas dos receptores olfactivos e assim permitir a detecção de novos odores [16, 17].

Os receptores olfactivos correspondem aos sensores de gases e cada composto apresentará uma “impressão digital” característica para esse conjunto de sensores. Estes sinais (“impressão digital”) são posteriormente tratados por técnicas de reconhecimento de padrões, o que simulam o cérebro em termos instrumentais.

Têm sido utilizados vários tipos de sensores no desenvolvimento de narizes electrónicos, desde sensores baseados em semicondutores de óxidos metálicos, polímeros orgânicos condutores, sensores ópticos, electroquímicos e sensores acústicos. A quantidade e complexidade dos dados recolhidos pelo nariz electrónico, muitas das vezes não-lineares, podem tornar a análise difícil [18-20].

As redes neuronais artificiais (ANN) e a análise em componentes principais (PCA) têm sido os métodos de reconhecimento de padrões mais usados para tratar os dados obtidos por narizes electrónicos e têm mostrado resultados promissores no reconhecimento de compostos voláteis. A análise em componentes principais é um método de reconhecimento de padrões usado para reduzir a dimensionalidade dos dados facilitando assim a representação e interpretação dos dados [19].

Os dados de um conjunto de sensores de um nariz electrónico podem não ter uma natureza linear. Nestes casos as redes neuronais artificiais são uma ferramenta poderosa que permite ajustar facilmente modelos não-lineares a estes dados. Vários estudos mostraram que a utilização das redes neuronais artificiais em conjunto com uma bateria de sensores permite a identificação de um número de compostos voláteis superior ao número de sensores usado na bateria de sensores. Além disso, possibilita a utilização de sensores menos selectivos sem que se percam as capacidades de reconhecimento do sistema. Uma vez treinada a rede para o reconhecimento de determinados compostos, a identificação é muito rápida e simples, o que possibilita a utilização destes aparelhos *in situ* [17, 18, 20].

As redes neuronais artificiais são constituídas por elementos de processamento simples, neurónio artificial, e que utilizados com um número elevado de unidades interligadas permitem a execução de tarefas complexas [21].

O perceptrão simples é uma rede de apenas uma camada, constituída por vários neurónios, o elemento fundamental e mais simples da rede neuronal. Na figura 2.4 está representado um modelo de um neurónio artificial.

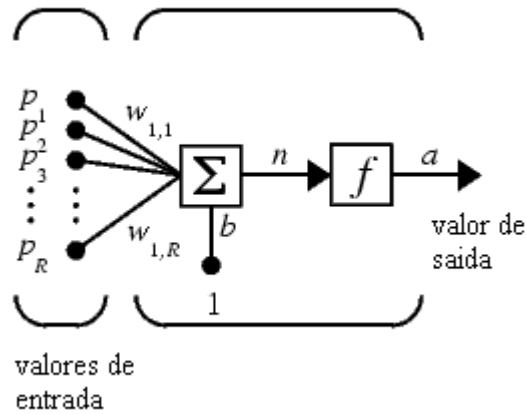


Figura 2.4 – Modelo de um neurónio artificial [22].

O neurónio é uma função do somatório da multiplicação dos elementos de entrada (p_R) pelo seu peso (w_R) e da “bias” (b). O valor de saída do neurónio pode ser escrito como:

$$a = f(n) \quad \text{Equação 2.6}$$

onde

$$n = \sum w.p + b \quad \text{Equação 2.7}$$

A função (f), normalmente não linear, é chamada a função de activação e pode ser de vários tipos: binária, sigmóide, gaussiana, entre outras [21].

Quando uma rede é constituída por vários perceptrões designa-se por perceptrão de multicamada, e as entradas dos neurónios de uma camada são as saídas dos neurónios da camada anterior [21].

O treino da rede é normalmente resolvido recorrendo a um método designado de retropropagação do erro. Este é um algoritmo iterativo que minimiza a diferença entre o valor real e o valor obtido pela rede, através da optimização dos parâmetros (w) e (b) de todos os neurónios da rede [21].

Este processo ocorre no sentido inverso da rede neuronal e inicia-se atribuindo aleatoriamente valores aos parâmetros [19].

Na figura 2.5 encontra-se um esquema de uma possível rede neuronal. Esta rede exemplo é constituída por três camadas: uma inicial para entrada de dados, com 5 neurónios; uma intermédia com outros sete; e uma camada de saída com mais dois, perfazendo um total de 14 neurónios. Cada percepção pode ter diferentes números de neurónios, mas a função de activação dos neurónios tem de ser igual por percepção.

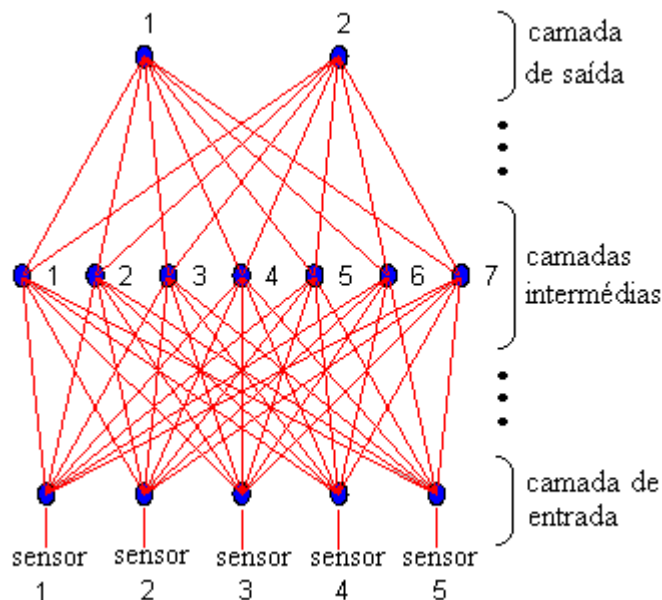


Figura 2.5 – Esquema de uma possível rede neuronal [24].

As redes neuronais artificiais são normalmente aplicadas aos narizes electrónicos de forma supervisionada, aprendendo com dados de amostras reais. Para construir a rede neuronal artificial são necessários três conjuntos de amostras diferentes: o grupo de treino, o grupo de monitorização e o grupo de teste. A calibração é a primeira fase da aprendizagem das redes neuronais e necessita dos dois primeiros grupos: o de treino, que é utilizado na fase iterativa de adaptação dos parâmetros da rede aos dados, e o grupo de monitorização, que é usado para decidir quando podemos parar o treino da rede. Este último grupo é usado para prevenir um excessivo ajuste da rede

aos dados, tornando assim a rede neuronal mais robusta ao ruído. O grupo de treino tem de ser constituído por amostras que representem o mais possível os vários compostos, nas diferentes concentrações em que poderão aparecer. Caso conjuntos de pontos de compostos diferentes estejam muito próximos será necessário um maior número de pontos perto da zona fronteira, para uma melhor separação dos grupos [19, 22, 23].

A validação é a última fase de aprendizagem e é efectuada com o grupo de teste, que é constituído por amostras que não foram usadas durante a fase de calibração. Uma vez construída a rede neuronal artificial e validada com o grupo de teste, o processo de identificação das amostras é bastante rápido e pode ser realizado por um aparelho portátil no local de amostragem [22, 23].

Uma das grandes vantagens das redes neuronais é que podem adaptar-se facilmente a qualquer função contínua de dimensão n , definida num domínio finito, com um determinado erro pré-estabelecido, mesmo que seja uma função complicada. Contudo é necessário ter atenção à sua flexibilidade para não acontecerem casos de um ajuste excessivo que resultam na perda da habilidade em estimar valores desconhecidos. Além disso, as redes neuronais não se podem aplicar na extrapolação de dados, funcionam apenas no intervalo de treino [22].

Neste trabalho foram também utilizadas funções discriminantes com um classificador de Bayes, para casos mais simples e em que os dados dos dois conjuntos tinham uma distribuição normal. Este método de classificação baseia-se no teorema de Bayes, descrito na equação 2.8:

$$P(\omega/x) = \frac{p(x/\omega)P(\omega)}{p(x)} \quad \textbf{Equação 2.8}$$

onde $P(\omega/x)$ é a probabilidade de uma amostra com as características de x pertencer ao grupo ω , $p(x/\omega)$ é a probabilidade de uma amostra do grupo ω ter as características de x , $P(\omega)$ é a probabilidade a priori de uma amostra

pertencer ao grupo ω , e $p(x)$ é a probabilidade total de uma amostra ter as características x .

$$p(x) = p(x/G(A)).P(G(A)) + p(x/G(B)).P(G(B)) \quad \text{Equação 2.9}$$

A partir deste teorema podemos estimar os modelos probabilísticos a partir dos dados disponíveis (classificação supervisionada). Para dois conjuntos de dados A e B com distribuição normal, a função de densidade normal de x pertencer ao grupo $G(A)$ para duas dimensões é dada por:

$$p(x/G(A)) = \frac{1}{2\pi(\text{cov}_A)^{1/2}} \cdot e^{-\frac{1}{2}[(x-\mu_A) \cdot (\text{cov}_A)^{-1} \cdot (x-\mu_A)]} \quad \text{Equação 2.10}$$

onde μ_A é a média das amostras do grupo A.

A função discriminante é dada pela fronteira entre os dois grupos onde:

$$P(G(A) / x) = P(G(B) / x) \quad \text{Equação 2.11}$$

Substituindo a equação anterior ficamos com:

$$\frac{p(x/G(A)).P(G(A))}{p(x)} = \frac{p(x/G(B)).P(G(B))}{p(x)} \quad \text{Equação 2.12}$$

daqui podemos eliminar $p(x)$. Substituindo os restantes parâmetros e aplicando logaritmos à expressão final, esta equação pode ser facilmente resolvida, e obtém-se uma função discriminante [21].

2.6. Referências

- [1] Sensors and transducers, a guide for technicians. Ian R. Sinclair, NEWNES (1992)
- [2] Chemical and Biochemical Sensors Part I, In: Sensors – A Comprehensive Survey, Volume 2, W. Göpel, T. A. Jones, M. Kleitz, J. Lundström, and T. Seiyama, VCH (1991).
- [3] M. I. S. Veríssimo, Aplicações analíticas de sensores de massa baseados em diferentes substratos piezoelétricos, (Tese de Doutorado) Universidade de Aveiro, Aveiro, 2003.
- [4] P. R. Silva, Influência da composição da membrana polimérica na sensibilidade dos sensores de massa, (Tese de Mestrado) Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.
- [5] M. T. Gomes, Desenvolvimento de sensores baseados em Microbalanças de Cristais Piezoelétricos para a determinação de CO₂ e SO₂, (Tese de Doutorado) Universidade de Aveiro, Aveiro, 1996.
- [6] G. W. Taylor, J. J. Gagnepain, T. R. Meeker, T. Nakamura e L. A. Shuvalov, Piezoelectricity – Ferroelectricity and related phenomena, Gordon and Breach Science Publishers, vol4 Berlin Germany, 1985.
- [7] R. C. Buchanan, Ceramic Materials for Electronics – Processing, properties and applications, Marcel Dekker Inc.: New York, 1983
- [8] Ramirez-Fernandez, F. J.; Peres, H. E. M.; Capítulo 6 - Sensores de Gás, Escola Politécnica da USP, São Paulo, Brasil, 2005.
- [9] <http://www.bostonpiezooptics.com/?D=6>
- [10] S. Y. Yurish, M. T. S. R. Gomes, Smart Sensors and MEMS, NATO Science Series – Mathematics, Physics and Chemistry, vol. 181 Dordrecht Netherlands (2003).
- [11] H. Varela, M. Malta, R. M. Torresi, Química Nova, 23(5), 2000.
- [12] G. Sauerbrey, Zeitschrift für Physik, 155 (1959), 206.

- [13] H. Baltes, W. Göpel, J. Hesse, Sensor Technology – Applications – Markets, em: Sensors Update, Volume 2, VCH New York USA, 1996.
- [14] M. T. S. R.Gomes, A. C.Duarte,; J. A. B. P. Oliveira, Talanta 1999, 48, 81.
- [15] N. Kasai, I. Sugimoto, M. Nakamura, Sens. Actuators B, 65 (2000) 114.
- [16] H. Baltes, W. Göpel, J. Hesse, Sensor Technology – Applications – Markets, em: Sensors Update, Volume 3, WILEY-VCH New York USA, 1998.
- [17] P. Keller, SPIE Application and Science of Computation Intelligence II conference, 3722(13) (1999), 144.
- [18] P. E. Keller, L. J. Kangas, L. H. Liden, S. Hashem, R. T. Kouzes, IEEE Northcon/Thechical Applications Conference, (1995).
- [19] J. E. Haugen, K. Kvaal, Meat Science, 49 (1998) S273.
- [20] J. Fu, G. Li, Y. Qin, W. J. Freeman, Sensors and Actuators B, 125 (2007) 489.
- [21] J. S. Marques, Reconhecimento de Padrões – métodos estatísticos e neuronais, IST Press, 1999.
- [22] F. Despagne, D.L. Massart, The Analyst, 123 (1998) 157R.
- [23] P. E. Keller, R.T. Kouzes, L.J. Kangas, IEEE Electro/94 International Conference in Boston USA (1994) 378.
- [24] http://en.wikipedia.org/wiki/Artificial_neural_network.
- [25] E. Schaller, J.O. Bosset, F. Escher; Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 31 (1998), 305.
- [26] National Instruments Corporation, Data Acquisition and Signal Conditioning – Course Manual Version 7.0, National Instruments, Texas USA (2003).

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

GERAIS E INSTRUMENTAÇÃO

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS E INSTRUMENTAÇÃO

Neste capítulo serão apresentadas detalhadamente as metodologias gerais utilizadas em todas as experiências. Há porém, metodologias e procedimentos experimentais que são específicos de cada trabalho e que serão descritos nos capítulos respectivos.

Neste trabalho, uma vez que o nosso sistema irá operar à temperatura ambiente, sem controlo da temperatura, foram usados cristais de quartzo com eléctrodos de ouro de 9 MHz de corte AT (Euroquartz). O uso de cristais de quartzo com corte AT torna-se determinante uma vez que são os mais sensíveis a variações de massa e os menos sensíveis à variação da temperatura em torno da região da temperatura ambiente [1, 2]. O método para determinar a frequência foi o método activo (oscilador) e serão apresentados neste capítulo os circuitos osciladores, instrumentos e software desenvolvidos e usados no trabalho.

3.1. Reagentes

Todos os reagentes foram utilizados como recebidos do fabricante, sem qualquer purificação ou tratamento prévio.

O gás de arraste foi comum em todos os sistemas e foi usado o azoto Alphagaz da ArLíquido.

Em cada um dos capítulos experimentais foram usados reagentes específicos desse trabalho.

No desenvolvimento do nariz electrónico para identificação e quantificação de compostos voláteis tóxicos, os sensores usados na bateria foram revestidos com: 1,10-decanoditiol (Dithiol, TCI D0015), solução de Nafion 117 (Nafion, Fluka 70160), ftalocianina de manganésio (II) (Mn_pht, Aldrich 379557), poli(dimetilsiloxano) (PDMS, ABCR 76189), fluoreto de tetrametilamónio tetrahidratado (TMAF, Aldrich 10,721-2) e ftalocianina de magnésio (II) (Mg_pht, Aldrich 40,273-7).

Os compostos nocivos foram detectados pelo nariz electrónico na fase gasosa. Para tal, os gases foram obtidos do espaço de cabeça de um frasco adaptado para o efeito contendo: amónia 25 % (Riedel-de-Haën 30501), propanona (Riedel-de Haën 32201), hexano (Lab-Scan C16C11X), ácido acético (Panreac 131008), tolueno (Riedel-de-Haën 32249), metanol (Fluka 65543), tetraclorometano (Riedel-de-Haën 32215), clorofórmio (Lab-Scan A3505E), etanol (Merck 100983) e diclorometano (Lab-Scan C2510L).

No desenvolvimento do nariz electrónico para a classificação de frutas, os sensores que compunham a bateria de sensores foram revestidos com: poli(fluoreto de vinilideno) (Kynar, Fluka 81432), solução de Nafion 117 (Nafion, Fluka 70160), ftalocianina de manganésio (II) (Mn_pht, Aldrich 379557), poli(dimetilsiloxano) (PDMS, ABCR 76189), Tenax TA 80/100 (Tenax, Supelco 21009) e trietanolamina (TEA, Merck 8377). Para encher os sacos das frutas foi usado ar sintético Alphagaz da ArLíquido.

Foram estudadas cinco espécies diferentes de frutas: laranjas New Hall, maçãs Starking, maçãs Golden, peras William e kiwis, todas compradas num supermercado local.

No desenvolvimento de um sistema analítico para detectar e quantificar H_2S no hálito de pacientes com doença periodontal começou-se por revestir dez cristais de quartzo com diferentes compostos: trietanolamina (TEA, Merck 8377), poli(fluoreto de vinilideno) (Kynar, Fluka 81432), solução de Nafion 117 (Nafion, Fluka 70160), ftalocianina de manganésio (II) (Mn_pht , Aldrich 379557), poli(dimetilsiloxano) (PDMS, ABCR 76189), Tenax TA 80/100 (Tenax, Supelco 21009), flureto de tetrametilamónio tetrahidratado (TMAF, Aldrich 10,721-2), ftalocianina de magnésio (II) (Mg_pht , Aldrich 40,273-7), 1,4-poli(isopreno) (Fluka 81445), mercapto hexanol (Fluka 63762), como filme sensível ao H_2S .

O sensor seleccionado para o H_2S foi testado com diversos interferentes: etanol (Merck 100983), propanona (Lab-Scan A3501), isopreno (Riedel-de Haën 62791), disulfureto de carbono (Panreac 141244), pentano (Lab-Scan C2518), trimetilamina (TEA, Merck 821177), amoníaco (Aldrich 29,499-3), sulfureto de dimetilo (Aldrich M8,163-2), etanotiol (Fluka 04290), dióxido de carbono (ArLíquido), monóxido de azoto 5083 ppm (Praxair 10102-43-9), dióxido de azoto 5011 ppm (Praxair 10102-44-0) e monóxido de carbono que foi preparado através da adição de ácido fórmico (Panreac 131030) e ácido sulfúrico concentrado (Fluka 84720).

As amostras de ar expirado dos pacientes voluntários foram recolhidas em sacos de Tedlar 1L (SKC 231-01).

Para retirar o vapor de água das amostras e da linha de azoto usaram-se colunas com cloreto de cálcio anidro (Absolve 50075), um tubo de aço-inox em forma de U mergulhado numa mistura frigorífica de água com nitrato de amónio (Riedel-de Haën 11218) e membranas secantes de Nafion (Omnifit).

Foram testados quatro adsorventes como possíveis candidatos para a coluna de pré-concentração: peneiros moleculares 5A (Fisher scientific company M-521), carvão activado (Merck 3626719), tenax TA (Supelco 21009) e peneiros moleculares ETS4 (Cedido pelo grupo de materiais da Universidade de Aveiro).

O H_2S foi gerado a partir da adição de sulfureto de sódio (Panreac 211682) e de ácido sulfúrico (Fluka 84720). Para padronizar o H_2S usou-se iodato de potássio (Panreac 141540), iodeto de potássio (Panreac 121542), iodo ressublimado (M&B MU6609), tiosulfato de sódio (Merck 5269604) e hidróxido de sódio (Panreac 131687).

3.2. Métodos de aplicação dos revestimentos nos cristais piezoelétricos

A sensibilidade, estabilidade, reversibilidade e selectividade de um sensor depende do revestimento, da quantidade aplicada, e da distribuição que este tem na área activa do cristal. Desta forma, o revestimento dos cristais piezoelétricos é de extrema importância.

Foram utilizados três métodos para revestir os cristais a partir das soluções dos compostos escolhidos: aplicação de uma quantidade fixa com micropipeta (Fig. 3.1 a)), por spray (BADGER modelo 200) (Fig. 3.1 b)) ou utilizando um "Spin Coater" (Süss Delta 10 BM-AL 200.1) (Fig. 3.1 c)). Estes três métodos foram usados consoante as características físicas dos compostos, tais como solubilidade e viscosidade.

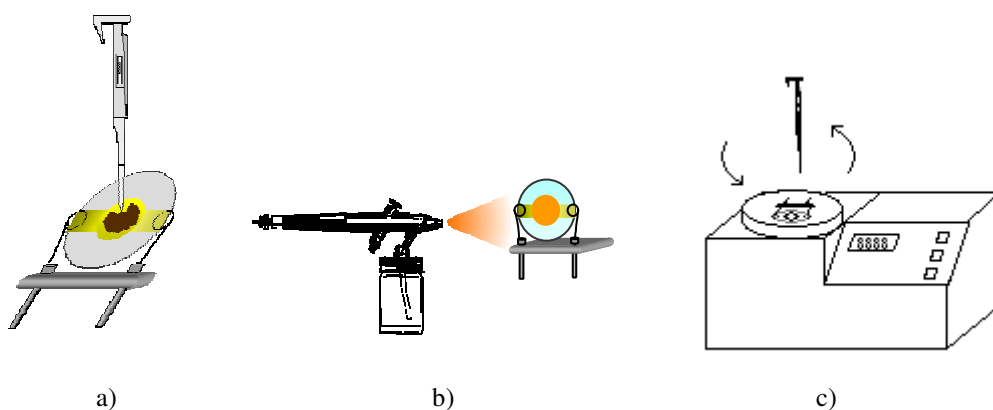


Figura 3.1 – Métodos de aplicação dos revestimentos nos cristais piezoelétricos: a) revestimento com micropipeta; b) revestimento por spray; c) revestimento com “spin coater”.

Para compostos muito solúveis e mais caros, foi usado o método da micropipeta de forma a minimizar os gastos do reagente. Já para compostos muito pouco solúveis o método melhor para aplicar o revestimento foi por spray. O último método, por spin coater, foi usado quando tínhamos revestimentos viscosos.

Os cristais revestidos foram então deixados a secar 24 horas e, posteriormente, inseridos na célula onde permaneceram em azoto até se obter uma frequência estável.

A sensibilidade à massa não é uniforme na superfície dos eléctrodos, de tal modo que em eléctrodos circulares, é maior no centro e diminui de forma gaussiana com o raio até extremidade dos eléctrodos e devido a diversos factores não controláveis, quaisquer destes procedimentos não assegura respostas iguais para sensores com igual quantidade de revestimento, pelo que se deve sempre testar a sua sensibilidade com curvas de calibração.

3.3. Montagem experimental para a caracterização dos sensores

A figura 3.2 mostra esquematicamente o sistema experimental com células de vidro usado para estudar os cristais piezoelétricos revestidos quanto à sua sensibilidade e selectividade. Ao longo do trabalho foi usado sempre este sistema para caracterizar os sensores, para podermos comparar as sensibilidades dos diferentes sensores nas mesmas condições de funcionamento. Este sistema funciona em fluxo de azoto (sendo o caudal controlado por um rotâmetro - Cole Parmer) e possui uma porta de injeccção (OMNIFIT 3301) para introduzir as amostras, uma célula de vidro para o sensor, o qual está ligado a um oscilador, e um frequencímetro (LEADER LF-827) para monitorizar a frequência.

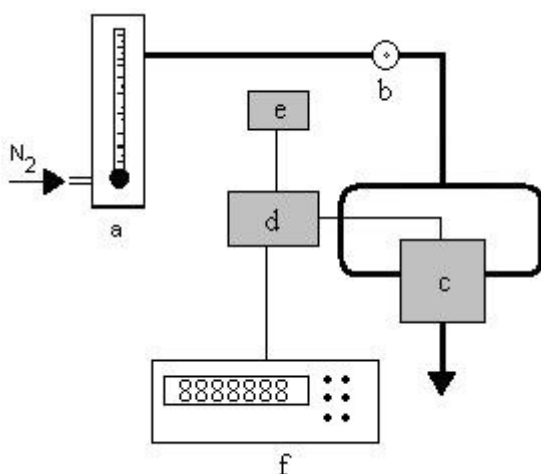


Figura 3.2 – Sistema experimental usado para caracterizar os sensores: a) rotâmetro, b) porta de injeccção, c) célula de vidro, d) oscilador, e) fonte de alimentação e f) frequencímetro.

O caudal de azoto neste sistema foi mantido a 50 mL/min. As amostras injectadas na porta de injeccção são transportadas até ao sensor pelo fluxo de azoto. Os tubos deste sistema eram de polietileno com 0,5 cm de diâmetro e o tempo de permanência da amostra desde a porta de injeccção até ao sensor era de aproximadamente 1 minuto. A célula usada foi uma célula de vidro, representada na figura 3.3. O caudal de azoto é dividido e direccionado perpendicularmente às duas faces do sensor. A célula de vidro usada neste

sistema possui um volume interno de 15 mL. Adoptou-se fluxo de azoto perpendicular ao sensor para reduzir a espessura do filme formado que dificulta o transporte de massa do analito desde o seio da corrente até à superfície da camada sensível, de forma a facilitar a transferência de massa do analito e consequentemente a formação do sinal.

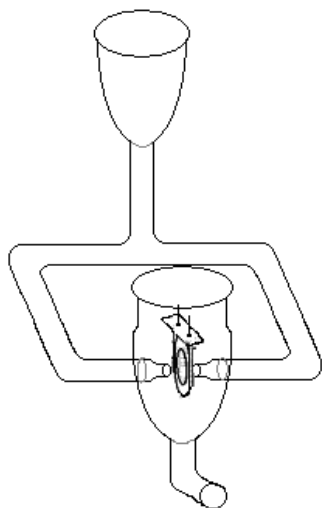


Figura 3.3 – Esquema das células de vidro usadas para caracterizar os sensores.

A leitura da frequência foi realizada por meio de um frequencímetro, com leituras em intervalos de 1 segundo. Este frequencímetro tem a capacidade de ler variações de frequência de 1 Hz para cristais com frequências fundamentais de ressonância na ordem dos MHz.

Após a estabilização da frequência dos sensores, foram injectados os compostos a estudar em diferentes quantidades e foram construídas curvas de calibração. As amostras injectadas provocam um decréscimo de frequência no sensor, que por sua vez é registado. Entre cada injeção houve sempre um intervalo de tempo de espera, para que a frequência da linha de base do sensor pudesse ser restabelecida com a ajuda do fluxo de azoto. Só após essa recuperação e estabilização era injectada a amostra seguinte. O tempo de

recuperação da frequência era determinado por vários factores como a quantidade de gás injectada e a da camada sensível do sensor.

O circuito oscilador usado nesta montagem foi construído no laboratório e está representado na figura 3.4. Estes osciladores usam inversores 7404 TTL para amplificar o sinal do cristal piezoeléctrico, um Schmitt trigger 7414 TTL e foi baseado no circuito referido por Bruckenstein [3].

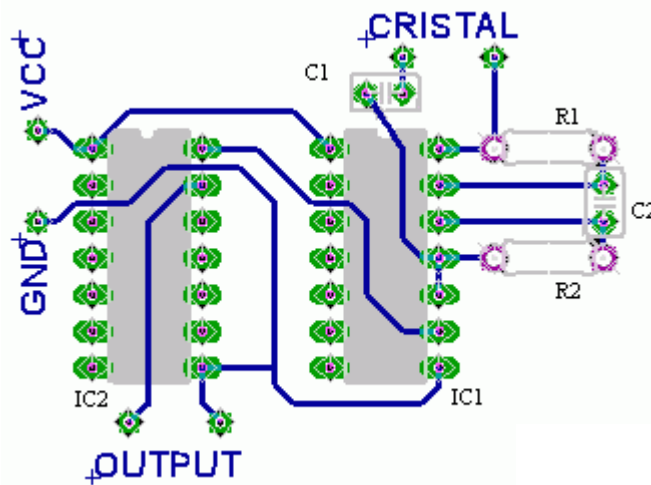


Figura 3.4 – Circuito oscilador usado para os sensores acústicos: IC1 – 7404, IC2 – 7414, C1 – 20 pF, C2 – 0,01 μ F, R1 e R2 – 390 Ω .

Este oscilador foi alimentado por uma fonte de 5 V.

Este método, como referido anteriormente, apenas permite monitorizar a frequência em série.

3.4. Optimização do sistema de análise

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver um nariz electrónico com um conjunto de sensores não-específicos e obter uma “impressão digital” dos compostos detectados, para posterior identificação dos sinais por técnicas de reconhecimento de padrões. Como tal, é necessária uma aquisição capaz de

ler vários sensores em simultâneo. Além disso pretende-se que este sistema seja capaz de detectar vários compostos nas concentrações normalmente encontradas em amostras reais. Estas concentrações podem ser de alguns ppm, mas também muito mais baixas, na ordem dos ppb. O que nos obriga a obter limites de detecção muito baixos, sensores muito sensíveis, e uma precisão e resolução na medição das frequências muito altas.

Em frequencímetros usuais, a determinação das frequências é realizada através da determinação dos impulsos do sinal do sensor por um contador num determinado tempo de aquisição, normalmente 1 ou 10 segundos. Este método permite a determinação da frequência dos sinais dos sensores com 1 Hz e 0,1 Hz de precisão, respectivamente.

No nosso estudo vamos operar em injeção em fluxo e, como tal, a aquisição da frequência deve ser em intervalos de tempo curtos, de segundo a segundo, para podermos observar a dinâmica de adsorção do analito no sensor. Estes tempos de aquisição implicam uma pior resolução na medição da frequência, ou seja, a aquisição de variações de frequência maiores. Isto resulta num decréscimo da sensibilidade do sistema a variações de massa, uma vez que será necessária uma maior quantidade de composto adsorvida para provocar uma variação de frequência possível de medir pelo sistema [2].

O sistema experimental da figura 3.2 estava muito aquém do necessário para construir um nariz electrónico. Não é versátil, não permite um incremento do número de sensores de uma forma fácil e simples, a configuração dos sensores teria de ser obrigatoriamente em série, e necessitava de tantos frequencímetros como sensores. Além disso, a aquisição apenas permite detectar variações maiores que 1 Hz e, devido ao elevado volume interno das células e dos tubos do sistema, existe uma grande dispersão, por difusão das amostras, o que consequentemente limita o sistema de análise na detecção de amostras de concentrações muito pequenas.

Neste capítulo encontram-se descritos os aspectos que foram otimizados na montagem experimental, de modo a obter o máximo de sensibilidade a variações de massa, que envolveu o desenvolvimento de novas células em PVC para os sensores, de novos osciladores e do desenvolvimento de um programa de aquisição. Foram feitos testes de comparação entre os sistemas de Vidro e de PVC e testes de comparação entre a disposição dos sensores no nariz electrónico em série e em paralelo.

3.4.1. Optimização do oscilador

Como vimos no capítulo 2, o método para contagem de frequências através da divisão do sinal de frequência do sensor é o método que permite a determinação da frequência com uma melhor precisão (0,1 Hz), em tempos de aquisição muito curtos. Contudo, como foi referido, perdem-se canais para aquisição de sensores, que podem ser necessários para a construção da bateria de sensores do nariz electrónico.

O problema da perda de canais para aquisição de sensores, pode ser resolvido introduzindo uma placa de circuito acoplada ao circuito oscilador, que faça a divisão do sinal dos sensores externamente, antes do sinal entrar na placa PXI-6608. A figura 3.5 mostra o circuito que foi acrescentado ao oscilador que permite fazer a divisão do sinal.

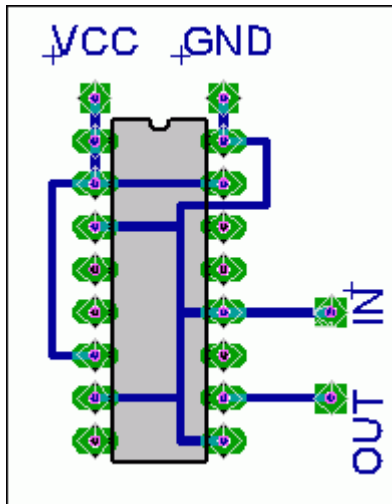


Figura 3.5 – Circuito divisor do sinal do oscilador com o semicondutor CMOS 74HC292.

Este circuito integrado CMOS (74HC292) pode dividir a frequência desde 2^2 a 2^{31} . Neste circuito da figura 3.5, o circuito integrado 74HC292 foi colocado de forma a dividir o sinal em 2^{20} , ou seja o sinal de saída deste circuito é 2^{-20} do sinal original. Como sabemos o factor de divisão, após a determinação da frequência por qualquer um dos métodos de contagem, podemos calcular a frequência do sinal original e desta forma foi necessário apenas um canal de aquisição da placa PXI-6608 por sensor.

Devido à grande precisão necessária na determinação das frequências dos sensores, foi necessário estabilizar a fonte de alimentação do oscilador e substituir o rotâmetro por um de caudais mais baixos. O circuito oscilador deste sistema experimental foi alimentado por uma fonte de alimentação de 9 V. Esta fonte foi estabilizada com um semicondutor regulador de tensão 7805, representado na figura 3.6, o qual fornece uma tensão bastante estável de 5 V para os osciladores.

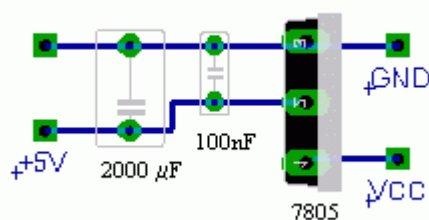


Figura 3.6 – Circuito regulador de tensão.

Deste modo é possível utilizar os oito canais da placa de aquisição PXI-6608 para aquisição de sinais utilizando o método que permite determinar a frequência com uma precisão de 0,1 Hz. O caudal de azoto neste sistema foi regulado, consoante o trabalho, para 3 mL/min ou 10 mL/min.

3.4.2. Software de aquisição de dados

Como foi referido anteriormente, o nariz electrónico deve possuir um conjunto de sensores diferentes. Como tal, o sistema de aquisição dos sensores deve ter a capacidade de adquirir simultaneamente os sinais de vários sensores ao longo do tempo. Para o efeito foi adquirida uma placa PXI-6608 da National Instruments. Esta placa é um contador com um relógio interno (timebase) altamente estabilizado de 80 MHz fornecendo uma porta de 32-bit com oito canais. Os programas para a aquisição das frequências dos cristais piezoeléctricos através desta placa foram desenvolvidos em LabView.

Para determinarmos a frequência dos sinais dos sensores utilizando os osciladores com divisor 74HC292 e utilizando o sinal de referência de 80 MHz como contador para as frequências, foi necessário desenvolver um programa de aquisição específico, para trabalhar com a placa de aquisição PXI-6608 nestas condições. Uma das grandes vantagens desta placa é que permite a aquisição em simultâneo dos 8 canais num segundo, em vez de ser em sequência como os sistemas GPIB, o que levaria 8 segundos para ler os 8 canais com 1 segundo para cada sensor.

Na figura 3.7 está representada uma pequena parte do programa principal construído em LabView, para a aquisição das frequências através da placa PXI-6608.

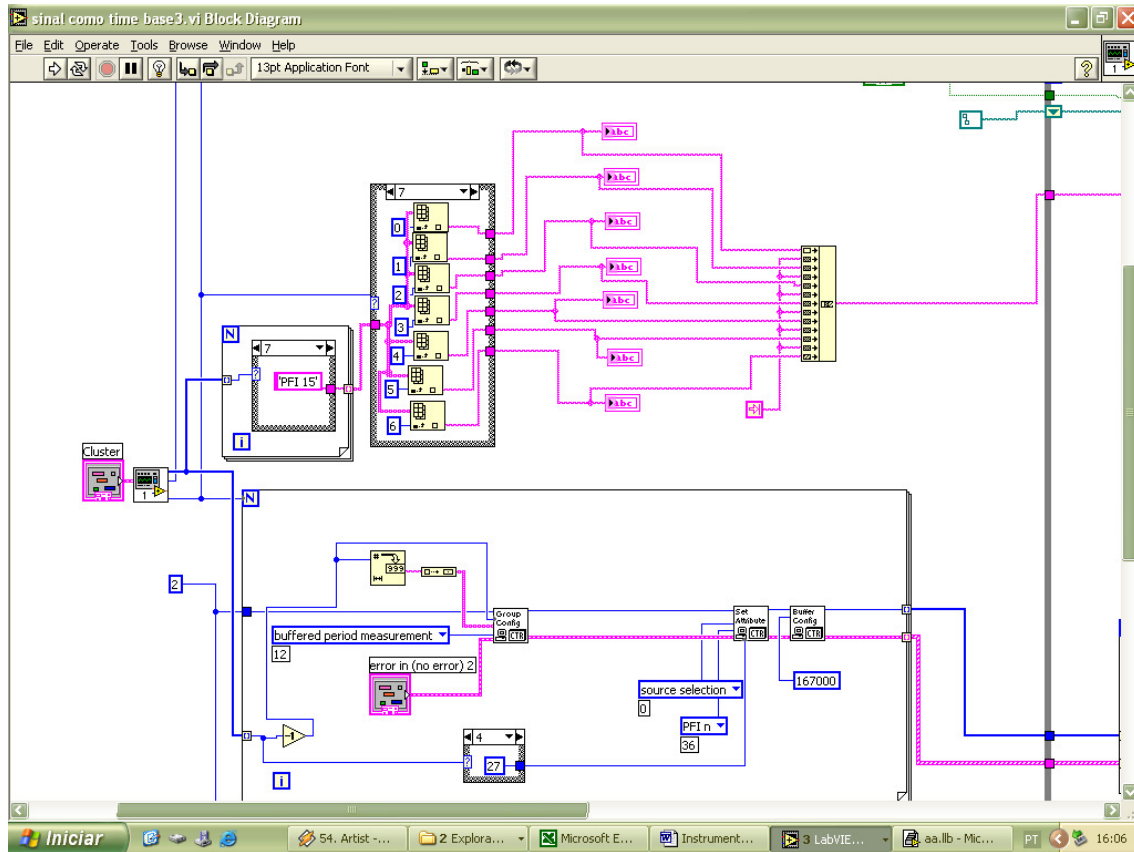


Figura 3.7 – Parte do programa de aquisição.

Este programa de aquisição é constituído por quatro subprogramas. No primeiro podemos indicar quais os canais que pretendemos usar para adquirir os sinais dos sensores. O segundo subprograma tem como função transformar em frequências, as contagens do período dos sinais de todos os canais ligados a cada segundo, tendo em conta o factor de divisão do circuito integrado 74HC292. O terceiro representa graficamente os dados actualizando-os a cada segundo e tem um "buffer" de 15 minutos para todos os canais. O quarto subprograma cria um ficheiro onde serão guardados os dados com indicação a que canais pertencem. Todos estes subprogramas são controlados pelo programa principal e é este que controla o modo de contagem da frequência e que adquire os dados provenientes da placa PXI-6608.

Na figura 3.8 encontra-se o “Painel frontal” do programa principal onde se podem ver os vários mostradores digitais e gráficos para os diferentes canais.

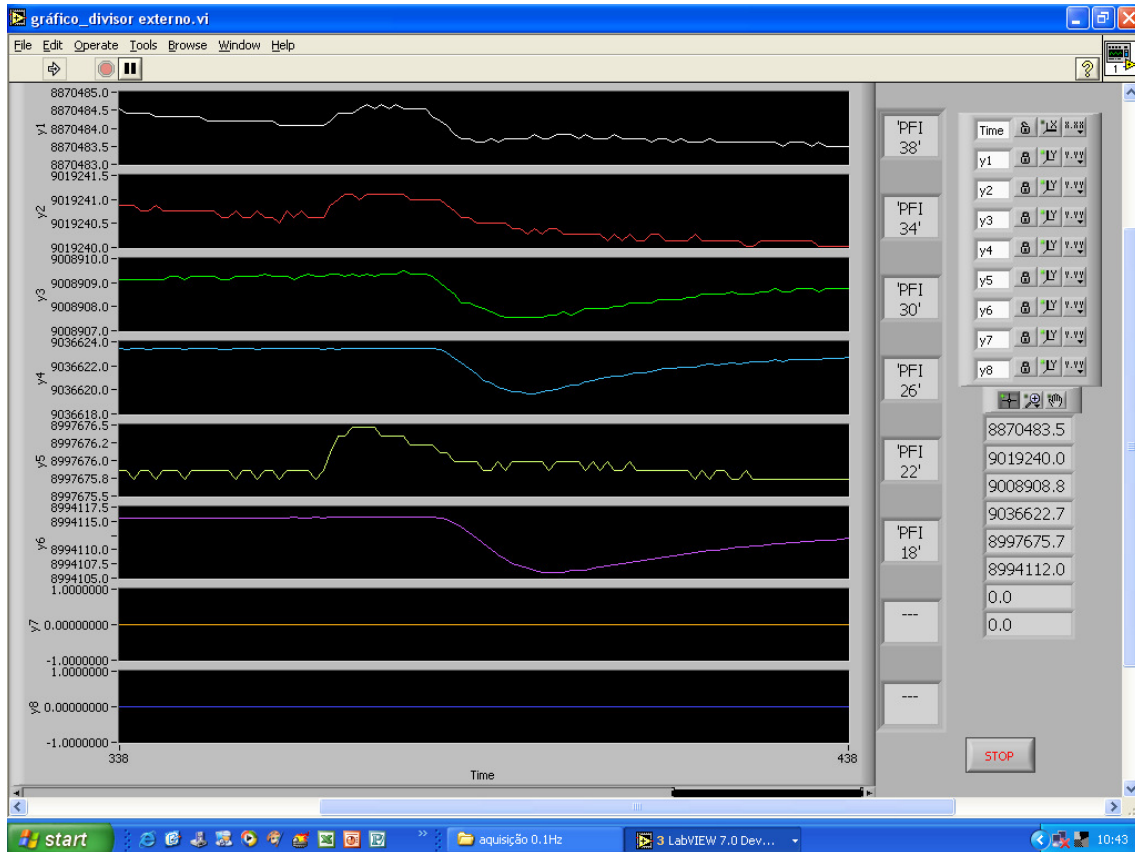


Figura 3.8 – Painel frontal do programa de aquisição.

A principal vantagem deste método consistiu na diminuição do erro na determinação das frequências dos sensores, permitindo ler variações de 0,1 Hertz em todos os canais (para sensores com frequências de ressonância fundamental na ordem dos 9 MHz), além de possibilitar a utilização dos oito canais da placa PXI-6608. No entanto, não podemos esquecer que estamos a aumentar os custos e a complexidade do sistema de aquisição, tanto em hardware como em software.

3.4.3. Optimização da célula do sensor

O sistema experimental inicial, representado na figura 3.2, com uma célula de vidro para acomodar o sensor, funciona com um caudal de 50 mL/min com tubos de polietileno de 0,5 cm de diâmetro. Os caudais neste sistema são baixos e estamos perante um sistema a funcionar em regime laminar, o que pode causar uma diluição da amostra injectada, devido a fenómenos de difusão. As amostras, nestes sistemas laminares, sofrem um alargamento dentro dos tubos do sistema desde a porta de injeção até ao sensor e consequentemente originam respostas mais baixas e recuperações lentas.

Uma vez que não é possível aumentar o caudal de forma a passarmos a funcionar em regime turbulento, vamos reduzir o volume de todo o sistema experimental, desde as células aos tubos do sistema, para minimizar os efeitos causados pelo regime laminar.

Foram portanto redesenhadas e construídas novas células em PVC, de volume interno reduzido, para acomodar os sensores. Na figura 3.9 encontra-se representada esquematicamente uma célula em PVC em detalhe.

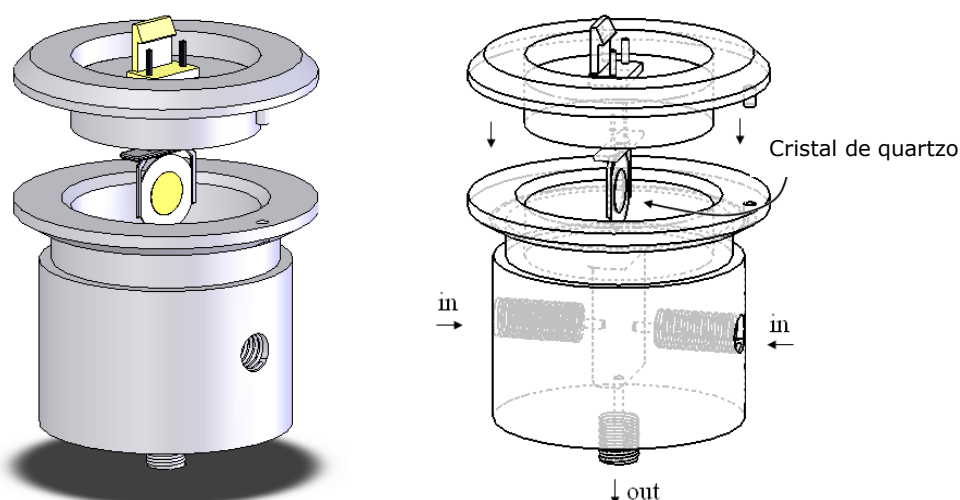


Figura 3.9 – Célula em PVC de volume reduzido.

Cada célula possui duas entradas, direccionadas para as faces do cristal piezoeléctrico, e uma saída no fundo. Com estas novas células foi possível reduzir o volume de 15 mL nas células de vidro para 0,35 mL nas células de PVC, e ao mesmo tempo, as entradas e saídas roscadas permitem uma fácil ligação aos tubos de Teflon.

3.4.4. Montagem experimental otimizada

O sistema experimental da figura 3.10 é a nova versão melhorada do sistema anterior com célula de vidro da figura 3.2. Como já foi referido, o sistema possui uma aquisição que permite ler variações de frequência de 0,1 Hz, através de uma placa de aquisição PXI-6608 ligada a um computador. Para reduzir a difusão das amostras dentro do sistema, as células dos sensores foram reduzidas e os tubos do sistema substituídos por tubos de Teflon de 3,2 mm de diâmetro. Este sistema permite com facilidade acrescentar ou diminuir o número de sensores, uma vez que todo o sistema é construído com peças que se adaptam às roscas da OMNIFIT.

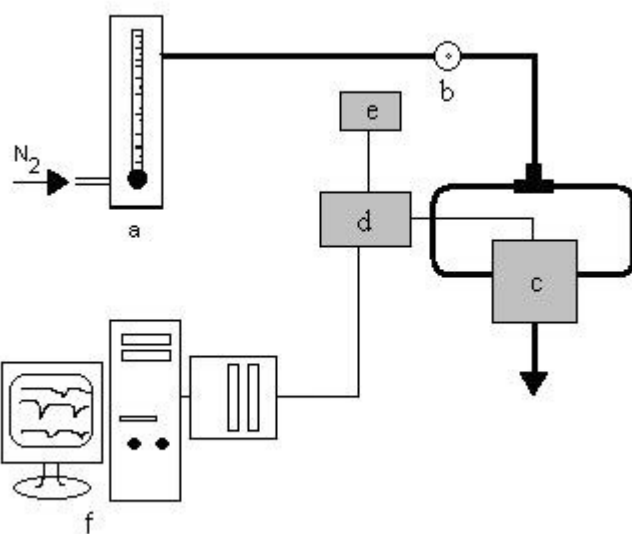


Figura 3.10 – Sistema experimental com células de PVC e com sistema de aquisição PXI-6608. a) rotâmetro; b) porta de injeção; c) célula de PVC; d) oscilador com circuito divisor; e) fonte de alimentação; f) aquisição PXI-6608 acoplada a um computador.

Este sistema experimental foi construído com tubos de Teflon, o caudal de azoto foi reduzido para 3 mL/min, funciona com os novos osciladores com circuito divisor 74HC292, com as células de PVC, e com o novo sistema de aquisição PXI-6608, com o respectivo software de aquisição.

3.5. Comparação das montagens experimentais vidro vs. PVC

Na figura 3.11 estão representados os resultados obtidos para diferentes injeções de NH_3 com os dois sistemas experimentais. O sensor usado neste estudo foi um cristal piezoelétrico revestido com uma ftalocianina de $Mg(II)$ e foi o mesmo nos dois casos. Os pontos em forma de losangos a azul são os dados obtidos pelo sistema experimental da figura 3.2, com célula de vidro e um caudal de azoto de 50mL/min, e os pontos em forma de quadrados encarnados são as respostas obtidas pelo sistema experimental da figura 3.10, com a célula nova de PVC e um caudal de azoto de 3 mL/min.

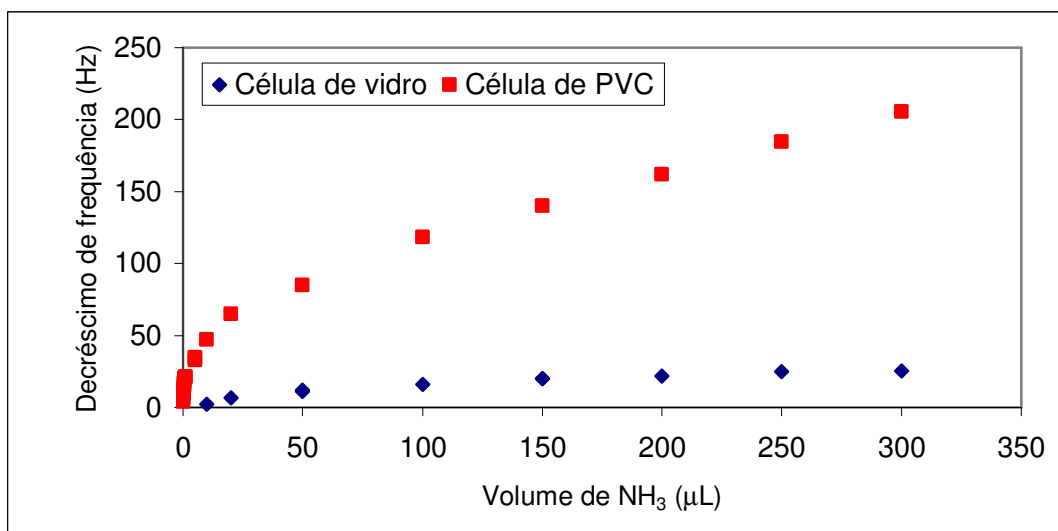


Figura 3.11 – Resultados obtidos com os dois sistemas experimentais, célula de vidro e célula de PVC, para diferentes quantidades de NH₃, usando o sensor revestido com ftalocianina de Mg(II).

Como se pode confirmar com um teste t emparelhado unilateral, para as amostras entre 20 e 300 μL de NH₃, o $t_{\text{calculado}}$ foi superior ao t_{tabelado} (7,26 e 1,86 respectivamente quando $P=0,05$ e $v=9$). Daqui se conclui que os resultados obtidos com o sistema novo, com a célula de PVC, foram estatisticamente superiores aos resultados obtidos no sistema antigo com a célula de vidro. Isto é facilmente observável na figura 3.11, onde as respostas do sensor ao NH₃ no sistema novo foram muito superiores às obtidas com o mesmo sensor nas células de vidro do sistema antigo. Comparando as rectas de calibração obtidas para as amostras comuns, entre 50-300 μL de NH₃, o sistema experimental com a célula de PVC foi 7,4 vezes mais sensível que o sistema com célula de vidro, com um declive de 0,49 Hz/μL de NH₃ na célula de PVC ($r=0,996$) e um declive de 0,066 Hz/μL de NH₃ na célula de vidro ($r=0,986$). Além disso, foi possível injectar quantidades 200 vezes mais pequenas de NH₃ com o sistema experimental novo, até 0,1 μL de NH₃ ($\Delta F=4,2$ Hz), e obteve-se uma recta com um declive de 26,2 Hz/μL de NH₃ ($r=0,9991$), enquanto que a quantidade mais baixa injectada no sistema com célula de vidro foi 20 μL de NH₃ ($\Delta F=6$ Hz).

Na tabela 3.1 encontram-se os limites de detecção (LD), obtidos nos dois sistemas experimentais.

Tabela 3.1 – Limites de detecção para o NH_3 obtidos nos dois sistemas experimentais, célula de vidro e célula de PVC, com o sensor revestido com ftalocianina de Mg(II) .

	Célula de vidro	Célula de PVC
LD (μL)	9,7	0,05
LD (μg)	6,9	0,037

Como podemos ver, o limite de detecção do sistema da célula de PVC foi quase 200 vezes inferior ao da célula de vidro, 37 ng e 6,9 μg , respectivamente. Mostrou-se neste trabalho que foi possível melhorar a sensibilidade e diminuir o limite de detecção aos gases com o sistema experimental novo com as células de PVC.

3.6. Bateria de sensores do nariz electrónico com arranjo em série vs. em paralelo

A bateria de sensores do nariz electrónico poderá ter duas configurações base, sistema em série, no qual os sensores estão ordenados em sequência, e sistema em paralelo, no qual existe um dispositivo que divide o caudal para os diferentes sensores.

O sistema de aquisição PXI-6608 tem a possibilidade de adquirir no máximo 8 sensores em simultâneo, no entanto divisor do caudal que usámos limita-nos a um máximo de 6 sensores.

Para testarmos estas duas configurações, série e paralelo, foram escolhidos alguns sensores, de um conjunto de diferentes revestimentos,

sensíveis ao CO_2 , H_2O e acetona, que tinham sido caracterizados através do sistema experimental da figura 3.2 com célula de vidro.

Foram construídos e testados alguns sistemas em série com baterias de 3, 4 e 5 sensores, nos quais eram injectados os compostos isolados, CO_2 , H_2O e acetona (figura 3.12).

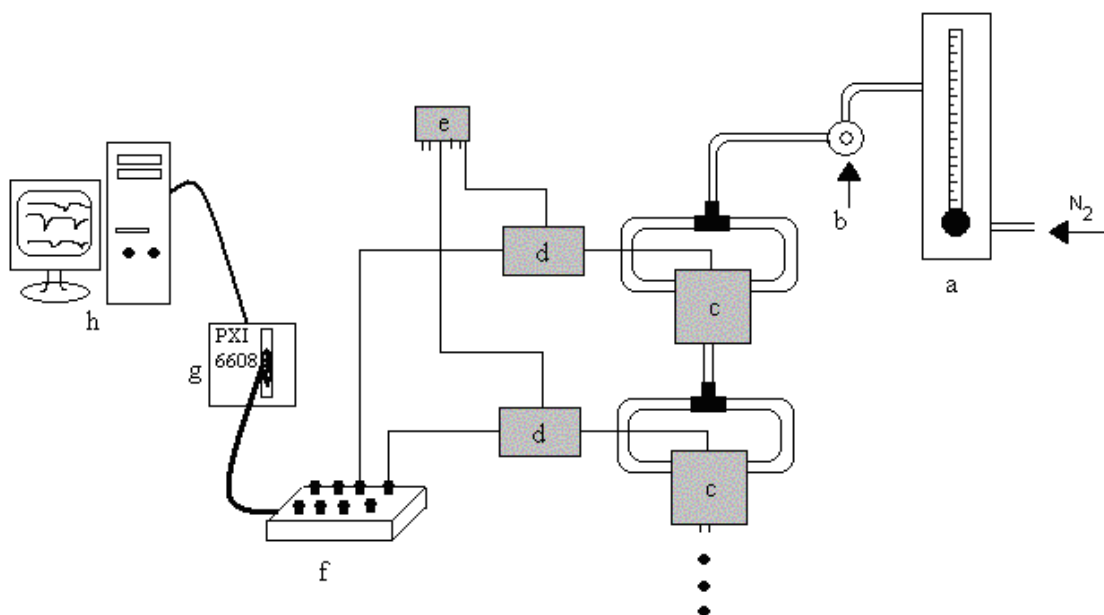


Figura 3.12 – Sistema de aquisição para vários sensores dispostos em série: a) rotâmetro; b) porta de injeção; c) células; d) osciladores; e) fonte de alimentação dos osciladores; f) painel BNC 2121; g) Counter/Timer PXI-6608; h) computador.

Nestes sistemas em série foram encontrados vários problemas que impediram o bom funcionamento dos sensores. Em primeiro lugar, o padrão das respostas aos compostos depende da sequência de sensores utilizada; em segundo lugar a sensibilidade dos sensores diminui significativamente ao longo da sequência, devido aos fenómenos de difusão. Finalmente, o aumento em comprimento do sistema de análise em série impediu o uso de mais de 4 sensores, observando-se uma sensibilidade muitíssimo baixa no quarto sensor.

A outra possibilidade para dispor a bateria de sensores no nariz electrónico é em paralelo. Na figura 3.13 está representado esquematicamente o dispositivo experimental testado com baterias de 5 e 6 sensores diferentes.

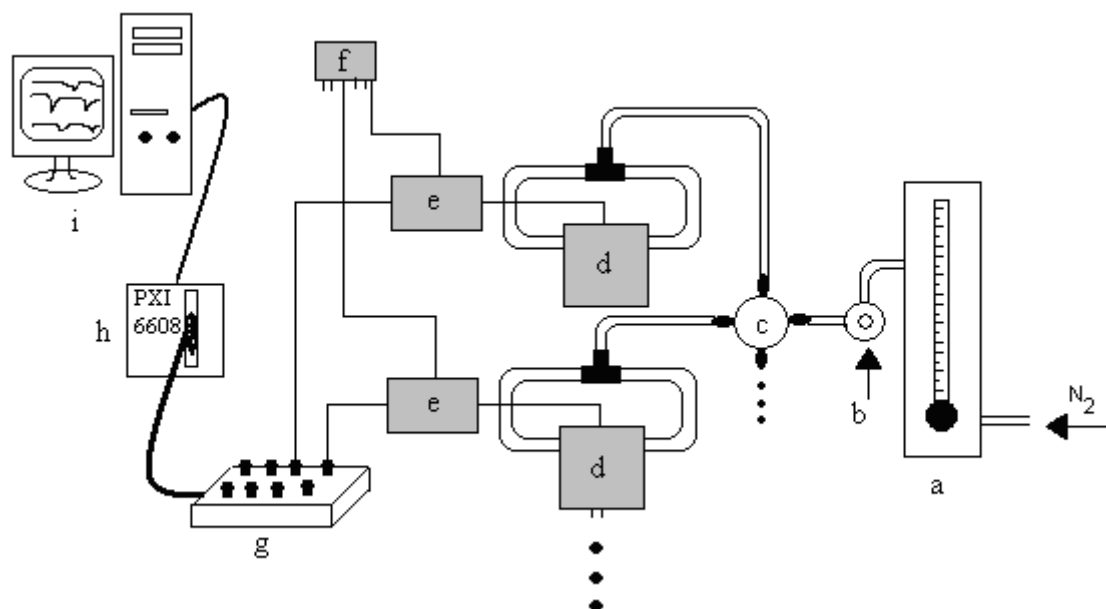


Figura 3.13 – Sistema de aquisição para vários sensores dispostos em paralelo: a) rotâmetro; b) porta de injeção; c) válvula de distribuição; d) células para os cristais; e) oscilador; f) fonte de alimentação; g) painel BNC 2121; h) Counter/Timer PXI-6608; i) computador.

Esta montagem experimental difere da anterior apenas num dispositivo que divide o caudal (OMNIFIT) para os diferentes sensores de forma paralela. Tudo o resto é igual ao anterior.

O sistema em paralelo permitiu logo à partida a utilização de um número maior de sensores, mas foi necessário aumentar o caudal de azoto do sistema de 3 mL/min para 10 mL/min.

Apesar da quantidade de amostra que chega a cada um dos sensores ser uma fracção da amostra injectada, devido ao dispositivo que divide o

caudal pelos vários sensores, a perda de sensibilidade é igual para todos e não é tão elevada como no caso do sistema em série.

3.7. Conclusão

O sistema experimental da figura 3.10, com as células em PVC, produziu resultados significativamente superiores aos do sistema com célula de vidro (figura 3.2) e por isso foi o sistema experimental escolhido para os trabalhos subsequentes. No entanto, o sistema da figura 3.2 com a célula de vidro foi usado ao longo da investigação para caracterizar os sensores individualmente, de forma a podermos comparar os sensores mais recentes com os sensores desenvolvidos no início da investigação.

A configuração da bateria de sensores escolhida para o nariz electrónico foi a disposição dos sensores em paralelo, uma vez que produziu os melhores resultados e permitiu a construção de uma bateria com um máximo de 6 cristais piezoeléctricos.

3.8. Referências

- [1] W. Göpel, T. A. Jones, M. Kleitz, J. Lundström, T. Seiyama, Chemical and Biochemical Sensors Part I, In: Sensors – A Comprehensive Survey, Volume 2, VCH, 1991.
- [2] Ramirez-Fernandez, F. J.; Peres, H. E. M.; Capítulo 6 - Sensores de Gás, Escola Politécnica da USP, São Paulo, Brasil, 2005.
- [3] S. Bruckenstein, M. Shay, Electrochim. Acta, 30 (1985), 1295.

4 NARIZ ELECTRÓNICO PARA IDENTIFICAR E QUANTIFICAR COMPOSTOS VOLÁTEIS

4 NARIZ ELECTRÓNICO PARA IDENTIFICAR E QUANTIFICAR COMPOSTOS VOLÁTEIS

4.1. Introdução

Todos os solventes deveriam ser considerados potencialmente perigosos. Os efeitos nocivos podem ocorrer por inalação, pelo contacto com a pele e os olhos tanto com o líquido como com o vapor, ou ainda por ingestão. A gravidade e o tipo de efeito provocado nos seres humanos pela exposição ao vapor dependem muito da concentração do composto, do tempo de exposição e da toxicidade do solvente. Exposições longas e repetidas a alguns solventes podem provocar perdas de consciência e alterações comportamentais, com degeneração das células nervosas do sistema nervoso periférico, que podem ser irreparáveis e em casos mais severos levar à morte. A monitorização de compostos orgânicos voláteis no ar tornou-se uma tarefa séria e importante devido a regulamentações impostas em vários países em todo o mundo, que determinam as concentrações e tempos máximos de exposição a que as pessoas podem estar expostas, por exemplo nos locais de trabalho. Os métodos correntes para a análise destes compostos no ar como cromatografia gasosa, espectroscopia no infravermelho, entre outros, possuem custos e tempos de análise elevados, não permitem a análise no local e requerem operadores especializados [1].

O uso de solventes é muito comum em vários processos industriais, em várias actividades rotineiras em laboratórios e em agentes de limpeza. Muitos armazéns em Universidades, bem como na maioria dos laboratórios, contêm frascos de vidro com compostos voláteis utilizados como solventes. A grande maioria destes compostos são solventes orgânicos e inorgânicos.

Muitas vezes ocorrem acidentes e um destes frascos parte-se dentro do armazém. A identificação e quantificação da concentração do contaminante no ar devem ser realizadas antes que alguém entre no armazém, de forma a determinar se a concentração está abaixo dos valores TWA (valor médio de exposição no período de oito horas) do respectivo composto, para iniciar-se a fase de limpeza com os meios de segurança adequados.

Os narizes electrónicos podem vir a realizar um importante papel na identificação e quantificação de compostos voláteis perigosos. Os narizes electrónicos podem ser constituídos por diferentes sensores químicos para gases, baseados em diversos tipos de transdutores, incluindo óxidos metálicos, polímeros condutores, sensores acústicos, sensores electroquímicos entre outros [2-4].

As baterias de cristais de quartzo piezoeléctricos têm sido usadas na detecção de VOCs por vários autores. Recentemente Je *et al.* [7] mediram a quantidade de VOCs totais no ar, enquanto Sugimoto *et al.* [8] apenas classificaram os VOCs em dois grupos: polares e não-polares. Si *et al.* [9] tiveram também sucesso na separação de VOCs pouco polares de não-polares e foram capazes de determinar a concentração de tolueno, mas apenas em misturas binárias de tolueno e etanol.

A selectividade de um sensor a um único composto é uma tarefa muito difícil de alcançar. Por essa razão, foi construída e montada uma bateria de sensores não-específicos aos compostos a detectar e utilizado um sistema de reconhecimento de padrões. Cada composto apresentará uma "impressão digital" característica nessa bateria de sensores tornando possível a sua identificação.

Neste trabalho foram revestidos seis cristais piezoeléctricos com compostos que interagem com os contaminantes a determinar. A escolha do revestimento a usar deve ser feita cuidadosamente, uma vez que se pretende que este seja estável ao longo do tempo, e que interaja de forma reversível e com alguma selectividade com o composto a detectar [5].

Com a bateria de sensores desenvolvida, para além de identificar os compostos voláteis no ar dentro de um armazém, fomos também capazes de quantificá-los.

Muitos dos autores tentam evitar a dispersão dos dados provocada por variações na concentração das amostras, uma vez que torna muito mais difícil a separação de grupos de amostras diferentes. Deste modo, a maioria dos autores ou não realiza variações na concentração dos gases ou tenta eliminá-la através da aplicação de algumas normalizações nos dados [11]. Esta é a razão porque a maioria dos trabalhos publicados nesta área apenas se limita a identificar os compostos detectados [2, 10-17], apesar da quantificação ser também muito importante para a maioria dos problemas.

Neste trabalho, aplicámos métodos de reconhecimento de padrões baseados em redes neuronais artificiais utilizando os dados obtidos de várias amostras com variações de concentração. Foi desenvolvido um nariz electrónico composto com seis sensores acústicos especialmente revestidos com filmes sensíveis para a identificação e quantificação de uma série de compostos nocivos comuns e normalmente encontrados em armazéns para solventes: amónia, propanona, hexano, ácido acético, tolueno, metanol, tetraclorometano, clorofórmio, etanol e diclorometano.

O nariz electrónico foi desenvolvido para resolver o problema na identificação e quantificação de um composto nocivo libertado acidentalmente por um frasco de 2,5 L dentro de um armazém com $3 \times 3 \times 2,5 \text{ m}^3$ de volume. A identificação e determinação da concentração destes compostos no ar foram conseguidas por três redes neuronais artificiais diferentes, duas a partir dos dados obtidos não-normalizados e uma rede muito mais simples utilizada

apenas para identificação dos compostos a partir dos dados normalizados. Utilizando esta última rede, a quantificação da concentração do composto no ar pode ser determinada posteriormente usando a curva de calibração do sensor mais sensível ao composto identificado.

4.2. Sistema experimental

O sistema experimental desenvolvido para a detecção dos compostos voláteis no ar foi baseado no sistema da figura 3.13, com os sensores dispostos em paralelo. Cada um dos seis sensores encontra-se numa célula de PVC separada. Um caudal constante de azoto, regulado por um rotâmetro, é dividido e direccionado para cada uma das células. A gama de volumes das amostras injectadas encontra-se entre 10 μ L e 250 μ L, e foram injectados por uma porta de injeção que se encontra antes do dispositivo que divide o caudal para cada um dos sensores. Cada um dos sensores está ligado a um circuito oscilador e as frequências de oscilação dos sensores são simultaneamente monitorizadas e armazenadas em intervalos de 1 segundo num computador.

As células usadas neste sistema foram as células optimizadas de PVC (figura 3.9), com os osciladores especiais e com o programa de aquisição desenvolvido para permitir uma melhor precisão e resolução na determinação da frequência, 0,1 Hz, utilizando o Counter/Timer Device PXI 6608.

4.3. Procedimento

Seis cristais de quartzo de corte AT de 9 MHz foram revestidos, em ambas as faces, com: Dithiol; Nafion; Mn_pht; PDMS; TMAF; Mg_pht. Os primeiros dois sensores foram revestidos por adição de uma gota da solução do revestimento em ambas as faces com micropipeta, enquanto todos os outros revestimentos foram aplicados em solução por spray. Os cristais

revestidos foram então deixados a secar 24 horas e posteriormente inseridos na respectiva célula, onde permaneceram em azoto até estabilizarem. Para cada um dos sensores revestidos com Dithiol, Nafion, Mn_pht, PDMS, TMAF e Mg_pht, obtiveram-se os seguintes decréscimos de frequência devido ao filme depositado: 8, 88, 20, 14, 17 e 11 kHz, respectivamente.

Cada composto nocivo foi introduzido num frasco, representado na figura 4.1, especialmente concebido para obter uma concentração de gás conhecida, através do conhecimento da pressão de vapor e da aplicação das leis de Raoult e dos gases perfeitos.

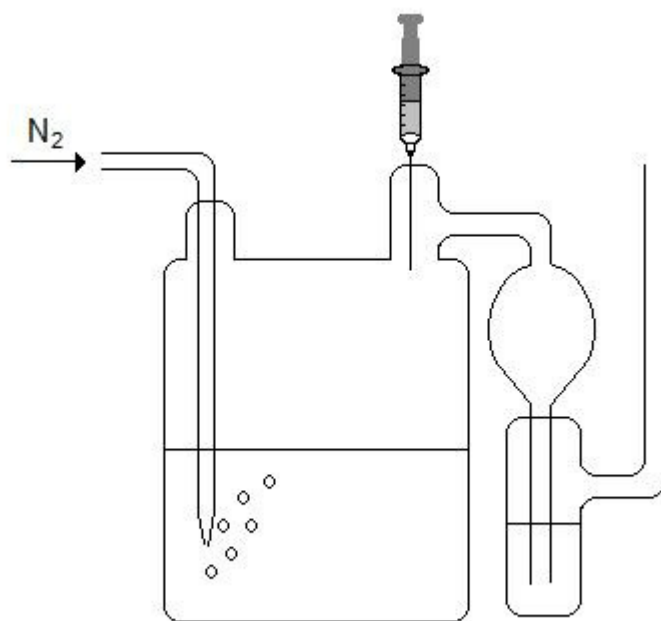


Figura 4.1 – Frasco usado para a obtenção das amostras gasosas com concentração conhecida.

Este frasco foi imerso num banho termostaticado a 20° C, e as amostras de solvente, na fase gasosa, foram retiradas do espaço de cabeça através de um septo e injectadas no sistema de análise através da porta de injeção.

Foram analisadas diferentes quantidades de cada um dos dez solventes. A gama de quantidades de cada solvente testada engloba a quantidade que poderá existir em 2,5 mL de ar de um armazém de solventes com $3 \times 3 \times 2,5 \text{ m}^3$, quando um dos frascos com 2,5 L se partir.

O sistema de análise opera em injeção em fluxo e a amostra é levada até aos sensores através do dispositivo divisor de caudal. A frequência dos seis sensores é adquirida e armazenada em simultâneo com intervalos de 1 segundo. Os decréscimos de frequência obtidos, devido à interacção dos solventes com os filmes dos sensores, foram utilizados posteriormente para a aprendizagem do algoritmo de reconhecimento de padrões (redes neuronais artificiais), para identificação e quantificação do composto. Após a injeção e resposta de uma amostra, foram necessários 3 a 10 minutos para obter a completa recuperação da linha de base dos seis sensores, e só após a recuperação foram injectadas novas amostras.

As redes neuronais foram construídas e testadas como descrito por Despagne *et al.* [18], com três grupos de amostras: grupo de treino, grupo de monitorização e grupo de teste. Após iniciar o treino das redes, foram adicionados ou retirados neurónios e/ou perceptrões até obter concordância entre os dados e as respostas da rede. Após a calibração, que envolve os grupos de treino e monitorização, foi efectuada a validação da rede com o grupo de teste.

4.4. Resultados e discussão

Foram injectadas um total de 100 amostras diferentes. Estas amostras foram divididas em três grupos: um grupo com 80 amostras para treino da rede neuronal artificial, 10 amostras para o grupo de monitorização e 10 amostras para o grupo de teste. O grupo de treino era constituído por 4 amostras de amónia (com quantidades desde 1,07 a 10,70 μg), 5 amostras de propanona (com quantidades desde 12,13 a 121,26 μg), 4 amostras de hexano (com quantidades desde 31,11 a 124,45 μg), 12 amostras de ácido

acético (com quantidades desde 1,87 a 7,49 μg), 4 amostras de tolueno (com quantidades desde 5,48 a 27,40 μg), 11 amostras de metanol (com quantidades desde 3,42 a 34,24 μg), 9 amostras de tetraclorometano (com quantidades desde 38,41 a 153,63 μg), 9 amostras de clorofórmio (com quantidades desde 20,90 a 208,96 μg), 11 amostras de etanol (com quantidades desde 2,07 a 20,74 μg) e 11 amostras de diclorometano (com quantidades desde 32,42 a 324,22 μg). Estas tabelas encontram-se nos ANEXOS A.

Na figura 4.2 podemos observar a aquisição dos sinais de uma injeção de metanol no sistema experimental.

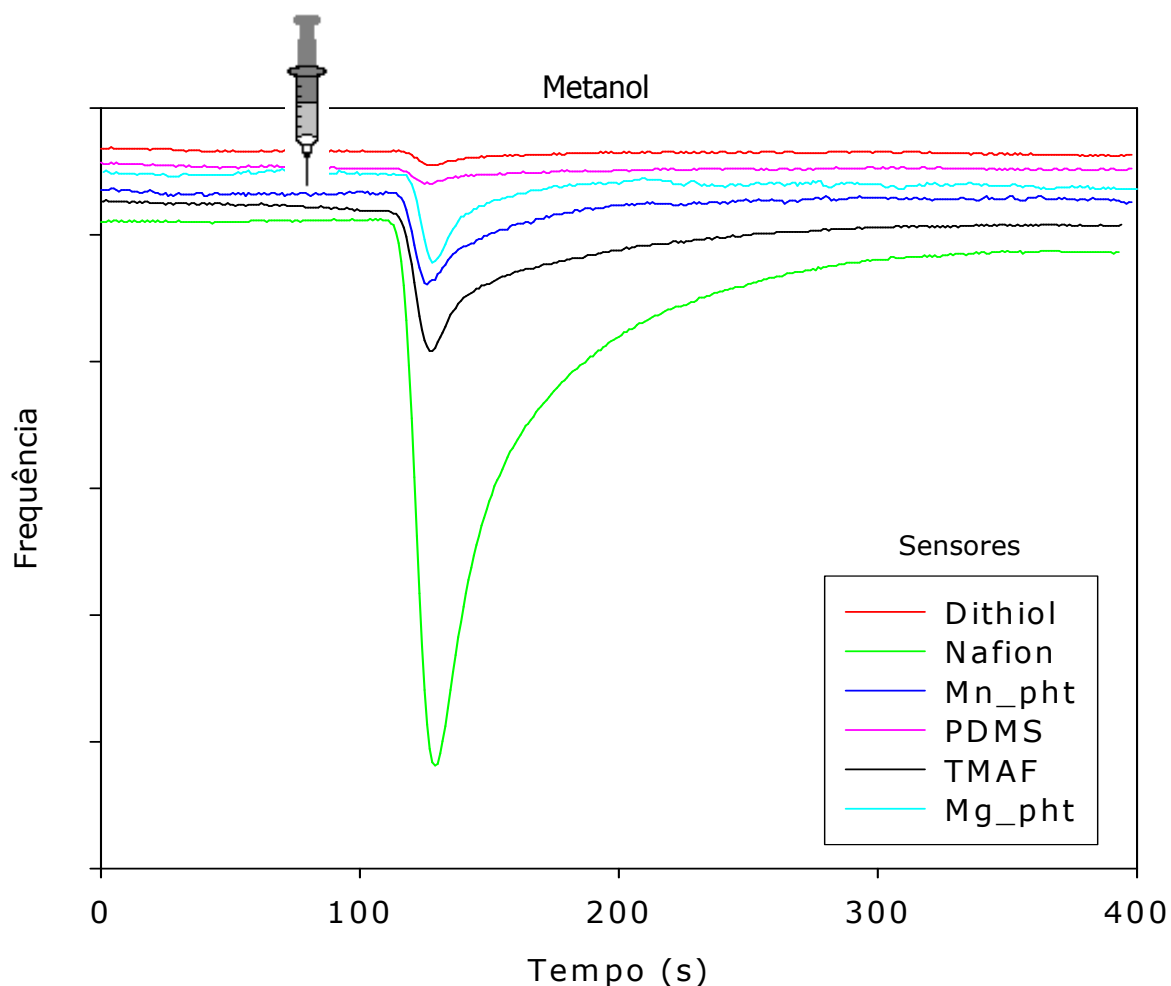
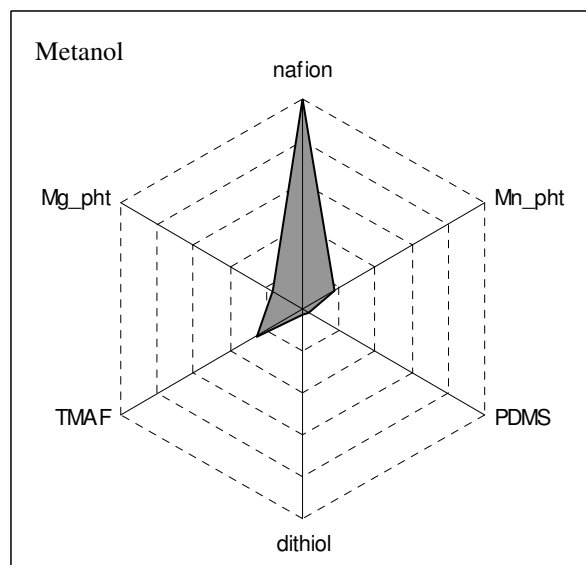
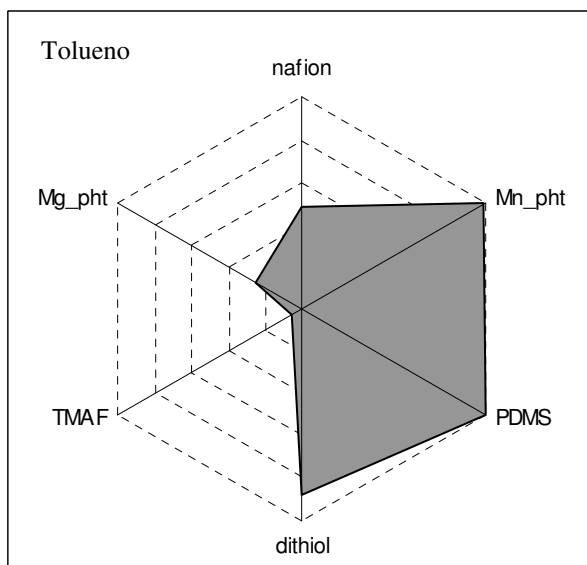
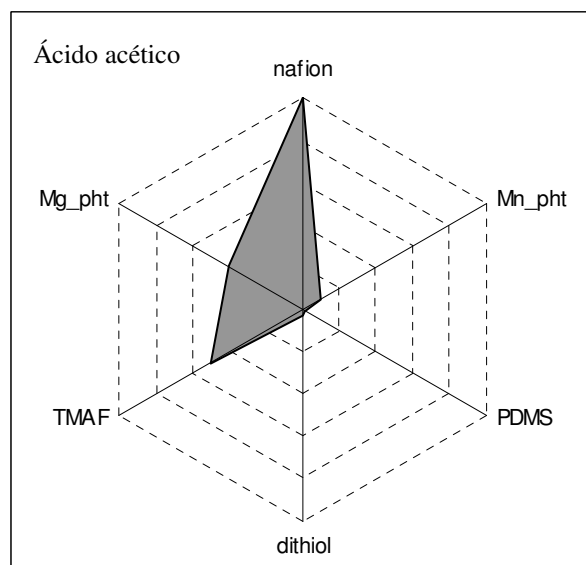
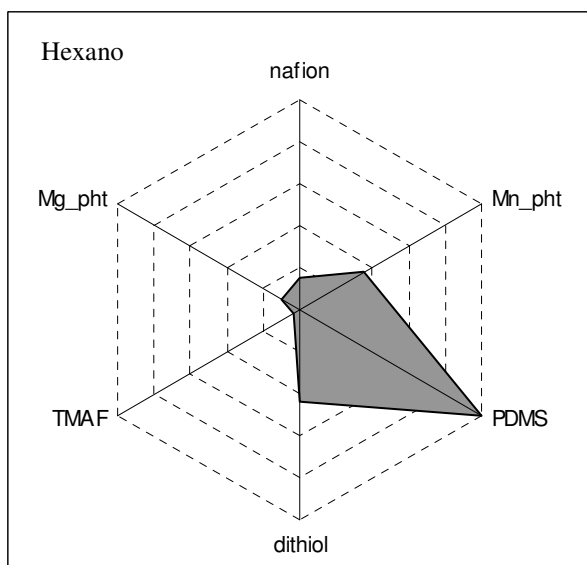
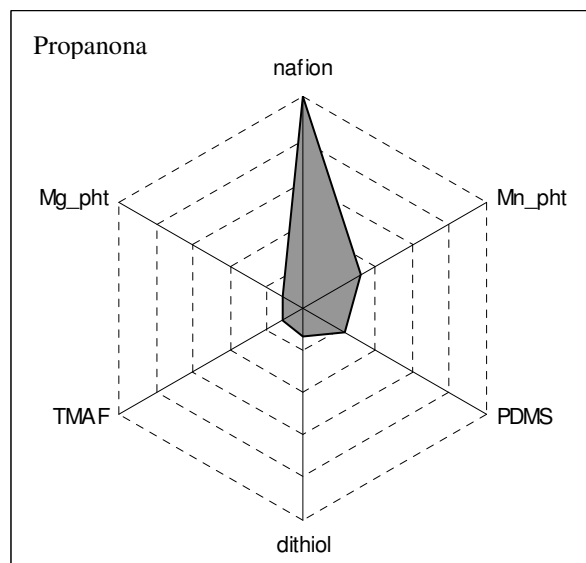
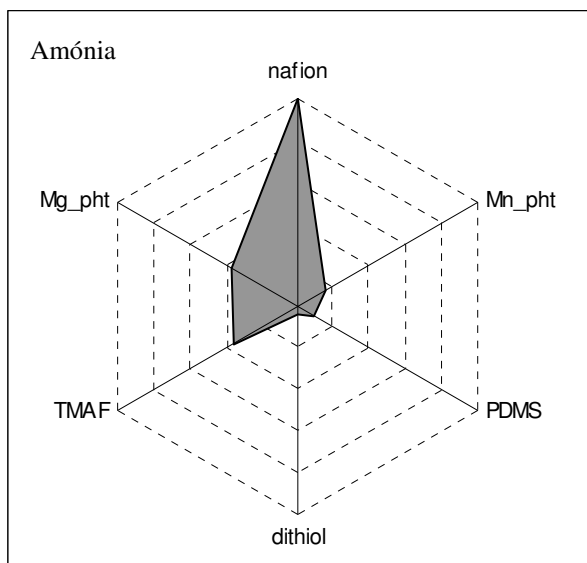


Figura 4.2 – Variações de frequência obtidas na bateria de sensores do sistema de análise quando foi injectada uma amostra de metanol.

A análise das amostras estendeu-se por mais de um mês, durante o qual a frequência dos seis sensores permaneceu estável e a sensibilidade dos sensores aos compostos não variou significativamente.

O grupo de monitorização era composto por uma amostra de cada solvente, e este conjunto de amostras eram diferentes das usadas no grupo de treino (ANEXOS A).

A figura 4.3 mostra os gráficos radiais com as “impressões digitais” obtidas a partir dos dados normalizados para cada um dos 10 solventes. Os dados desta figura foram normalizados para podermos representar os padrões de cada composto sem que as intensidades dos sinais dependessem da quantidade injectada.



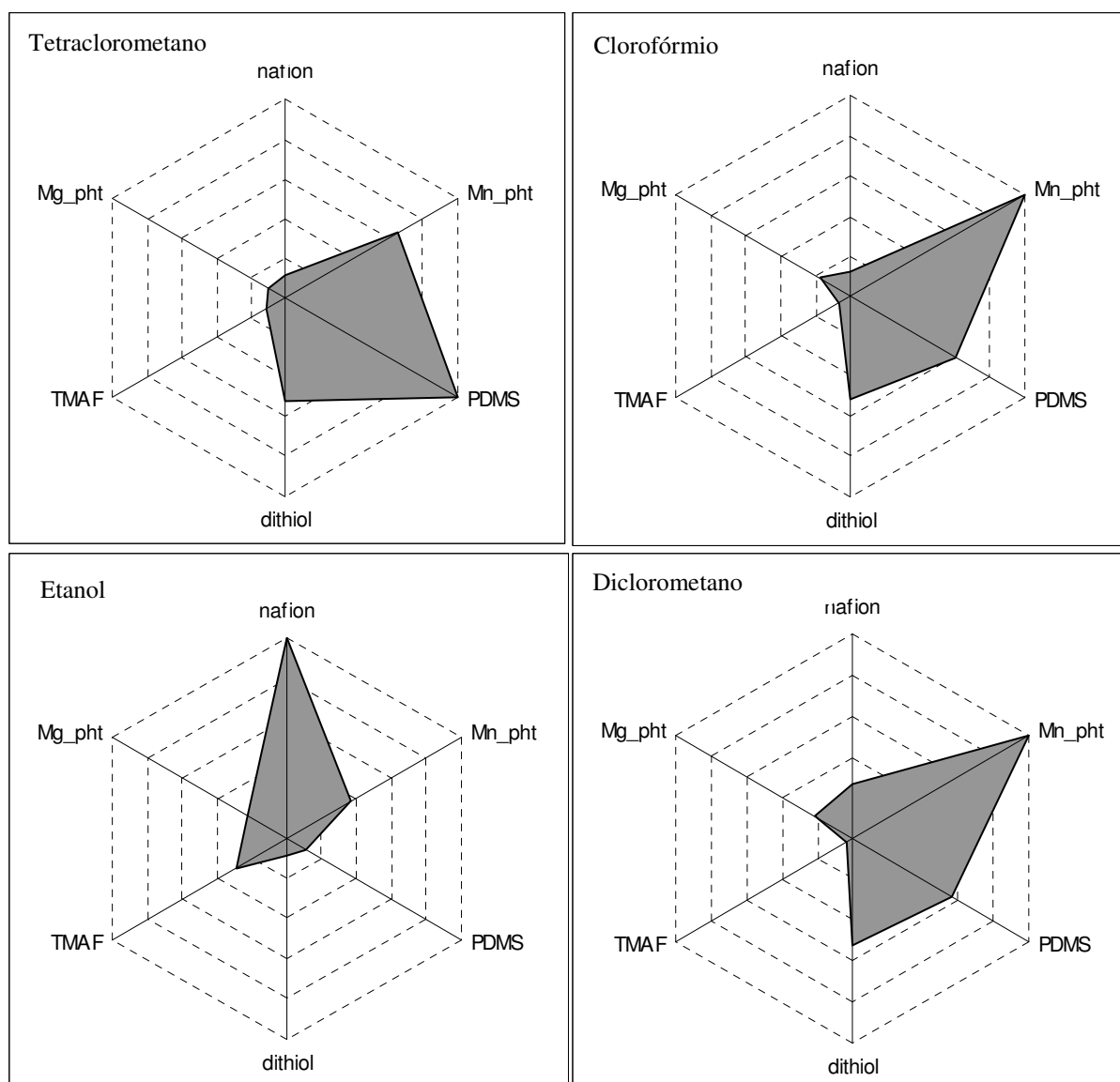


Figura 4.3 – Gráfico radial com as “impressões digitais” normalizadas que se obtiveram com a bateria de sensores para cada um dos compostos.

Como se pode ver, obtiveram-se diferenças significativas nos padrões de cada composto testado com esta bateria de sensores. Contudo, podem-se ver algumas similaridades nos padrões entre alguns compostos. Por exemplo, o sensor com maior sensibilidade tanto para o diclorometano como para o clorofórmio foi o sensor Mn_pht, enquanto para o hexano e o tetraclorometano o sensor com maior sensibilidade foi o sensor revestido com PDMS. Já o tolueno foi detectado com maior sensibilidade por ambos os revestimentos, o

sensor Mn_pht e o sensor PDMS. Os outros cinco compostos, amónia, etanol, metanol, propanona e ácido acético, mais polares do que os anteriores, foram detectados com maior sensibilidade pelo sensor de Nafion.

Foi construída uma rede neuronal artificial com 6 perceptrões, com um total de 56 neurónios artificiais, que foi aplicada aos dados obtidos pelos seis sensores. Esta rede possuía dois perceptrões de saída, um que devolve o número de identificação do solvente presente na amostra e o outro perceptrão que devolve a quantidade estimada do solvente na amostra de ar. Para cada composto foi atribuído um número de identificação, de modo a podermos introduzir os compostos na rede neuronal: amónia - 1; propanona - 2; hexano - 3; ácido acético - 4; tolueno - 5; metanol - 6; tetraclorometano - 7; clorofórmio - 8; etanol - 9; diclorometano - 10.

A tabela 4.1 mostra os resultados obtidos com esta rede neuronal quando aplicada ao grupo de teste. Como se pode observar, todos os compostos foram correctamente identificados.

Observando as quantidades estimadas nas amostras verifica-se que existem algumas diferenças em relação aos valores reais. Contudo, aplicando o teste t-emparelhado, ($\alpha = 0.05$), podemos dizer que essas diferenças não são estatisticamente significativas.

Tabela 4.1 – Resultados obtidos na validação da rede neuronal artificial com o grupo de teste. Compostos e quantidades injectadas vs. Resultados obtidos pela rede neuronal artificial.

Real (injectado)		Identificado pela rede	
Composto	Quantidade (μg)	Composto	Quantidade (μg)
1	7.5	1.0	8.3
2	60.6	2.0	50.8
3	43.6	3.0	28.3
4	1.9	4.0	2.1
5	16.4	4.9	12.0
4	2.6	4.0	1.8
7	115.2	7.0	162.9
8	73.1	8.0	88.8
9	10.4	8.9	12.0
10	162.1	10.0	164.8

De forma a identificar os sensores mais relevantes na bateria de sensores e reduzir a dimensionalidade dos dados, aplicou-se uma análise em componentes principais aos dados. Este procedimento permite também eliminar informação redundante.

A tabela 4.2 mostra os coeficientes de correlação obtidos com os seis sensores da bateria utilizada. Como se pode observar, existe algum grau de correlação entre o sensor Dithiol, o sensor Mn_pht e o sensor PDMS, o que nos poderá dizer que pelo menos dois destes sensores são redundantes e podem ser eliminados da bateria de sensores.

Tabela 4.2 Coeficientes de correlação obtidos entre os seis sensores da bateria utilizada no nariz electrónico.

	Dithiol	Nafion	Mn_pht	PDMS	TMAF	Mg_pht
Dithiol	1	-0.2139	0.9591	0.9415	-0.0778	0.5768
Nafion		1	-0.0747	-0.2157	0.8385	0.5441
Mn_pht			1	0.8246	0.0339	0.719
PDMS				1	-0.0648	0.427
TMAF					1	0.5851
Mg_pht						1

Fazendo uma análise em componentes principais foi possível reduzir a dimensionalidade dos dados de seis sensores para três variáveis (PCs), retendo 99 % da variabilidade dos dados. A representação gráfica dos dados pode agora ser realizada com os três PCs, o que permite a sua representação gráfica. A figura 4.4 mostra a representação dos dados através dos três primeiros componentes principais (PC1, PC2 e PC3). Podemos ver que os dados estão orientados segundo três direcções, de acordo com as similaridades descritas anteriormente.

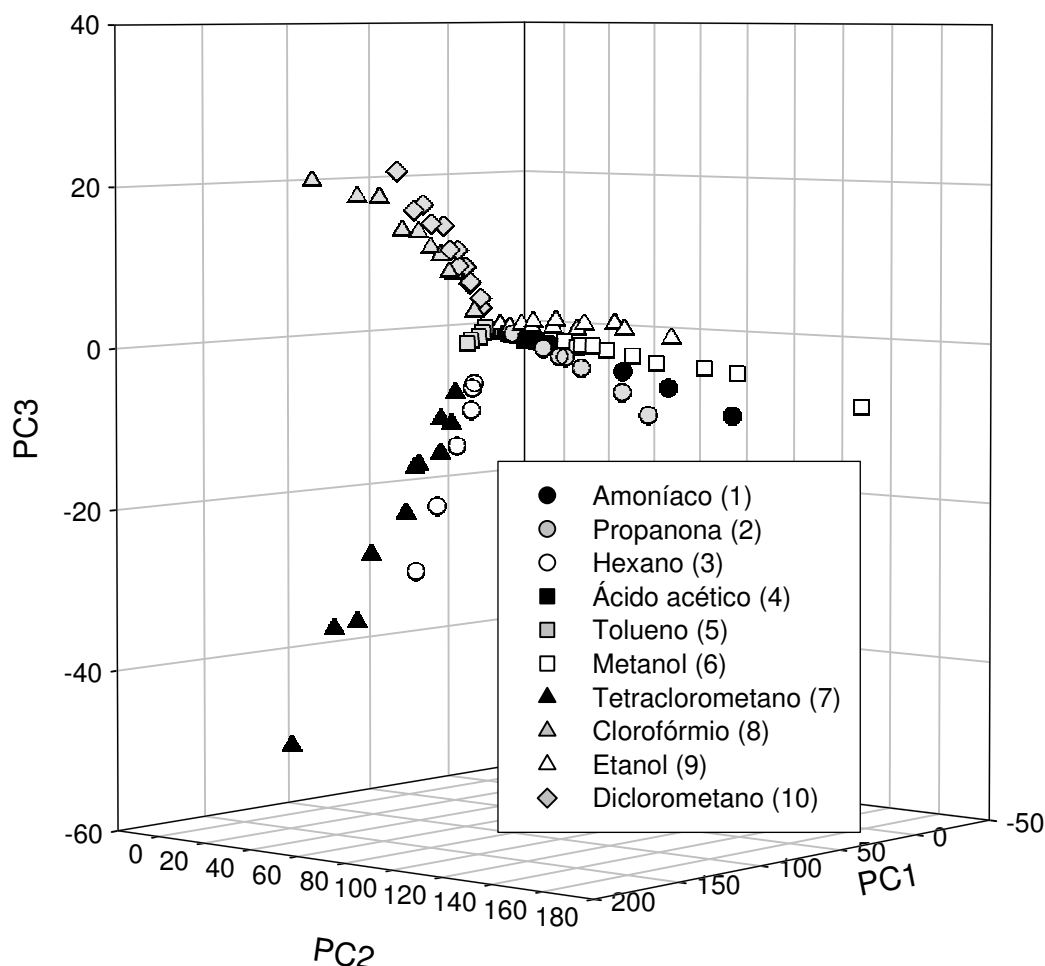


Figura 4.4 – Representação dos dados através dos três primeiros componentes principais.

Os dados do diclorometano e do clorofórmio estão visivelmente orientados na mesma direcção, enquanto os dados do hexano e do tetraclorometano estão disposto numa outra direcção. Os outros cinco compostos, amónia, etanol, metanol, propanona e ácido acético, encontram-se todos numa outra zona distinta na figura 4.4. O tolueno que tinha sido descrito como um caso particular, com dois sensores igualmente sensíveis que se destacavam, encontra-se entre as amostras de clorofórmio e hexano.

Foi construída uma nova rede neuronal artificial com 6 perceptrões, mas com um total de 49 neurónios artificiais, que se aplicou aos dados transformados pelos três componentes principais. A tabela 4.3 mostra os resultados obtidos com esta rede aplicada ao grupo de teste. Como se pode observar, todos os compostos foram mais uma vez correctamente identificados, obtendo-se ainda assim algumas diferenças nas quantidades estimadas nas amostras. Tal como anteriormente, a partir do teste t-emparelhado, ($\alpha = 0.05$) podemos dizer que não existem diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 4.3 – Resultados obtidos na validação da rede neuronal artificial com o grupo de teste. Compostos e quantidades injectadas vs. Resultados obtidos pela rede neuronal artificial.

Real (injectado)		Identificado pela rede	
Composto	Quantidade (μg)	Composto	Quantidade (μg)
1	7.5	1.00	6.6
2	60.6	2.00	22.4
3	43.6	2.98	47.3
4	1.9	4.00	1.8
5	16.4	5.00	4.9
4	2.6	4.00	2.3
7	115.2	7.00	123.4
8	73.1	8.00	80.1
9	10.4	9.00	11.7
10	162.1	10.00	153.8

A aplicação dos componentes principais permitiu a construção de uma rede neuronal com um menor número de neurónios artificiais e mais simples. Isto permitiu uma aprendizagem mais rápida e com menor esforço de cálculo que anteriormente, sem contudo perder as capacidades na identificação e quantificação das amostras. Estes resultados sugerem que os restantes componentes principais, os quais explicam apenas 1% da variabilidade dos dados, deverão conter informação confusa e/ou ruído. A partir dos pesos dos vectores próprios (tabela 4.4) podemos identificar os sensores TMAF e Mg_pht como os sensores com menor importância para identificar e quantificar as amostras. Estes são também os sensores com maior peso nos PCs rejeitados, PC4, PC5 e PC6, e que explicam os restantes 1 % da variabilidade dos dados.

Tabela 4.4 – Vectores próprios determinados a partir dos dados das amostras dos seis sensores e a variância total explicada por cada vector.

	PC6	PC5	PC4	PC3	PC2	PC1
Dithiol	0.8639	0.2572	0.0399	0.0523	0.0282	0.4271
Nafion	0.0557	-0.0525	0.2956	-0.1285	0.9308	-0.1545
Mn_pht	-0.2778	-0.2621	-0.0002	0.65	0.1958	0.6271
PDMS	-0.261	-0.0244	0.0262	-0.7312	0.0094	0.6291
TMAF	0.087	-0.1249	-0.9463	-0.0756	0.2743	-0.0213
Mg_pht	-0.312	0.9199	-0.1222	0.1336	0.1385	0.0643
Variância total %	0.03	0.09	0.72	4.9	26.9	67.3

Foi decidido usar uma rede neuronal artificial apenas para identificar os compostos nas amostras, uma vez que após uma correcta identificação dos compostos, a sua concentração pode ser calculada usando as curvas de calibração com o sensor mais adequado para o composto em questão. Isto permitiu a construção de uma rede neuronal muito simples, diminuindo

significativamente o tempo de aprendizagem da rede e o esforço de cálculo envolvido.

Para cada amostra os dados foram normalizados dividindo os dados dos seis sensores por amostra, pelo sinal maior dos seis sensores. Após esta transformação dos dados, aplicou-se uma análise de componentes principais e construiu-se uma rede neuronal artificial usando os três primeiros PCs obtidos.

A tabela 4.5 mostra os coeficientes de correlação obtidos entre os seis sensores com os dados normalizados. Como se pode observar, não existe uma correlação significativa entre eles.

Tabela 4.5 – Coeficientes de correlação obtidos entre os sensores com os dados normalizados.

	Dithiol	Nafion	Mn_pht	PDMS	TMAF	Mg_pht
Dithiol	1	-0.8977	0.9074	0.9061	-0.7727	-0.3532
Nafion		1	-0.8187	-0.9228	0.7789	0.446
Mn_pht			1	0.712	-0.7592	-0.2833
PDMS				1	-0.781	-0.5359
TMAF					1	0.6059
Mg_pht						1

Estes resultados indicam que nenhum dos sensores deve ser descartado e que todos os seis sensores deverão ser úteis na identificação dos compostos.

A figura 4.5 mostra a representação gráfica dos dados normalizados, através dos três primeiros componentes principais (PC1, PC2 e PC3). Estes três PCs representam 97 % da variabilidade dos dados e a partir dos pesos de cada sensor nos vectores próprios (tabela 4.6), podemos observar que o sensor menos importante na identificação das amostras é o sensor Mg_pht.

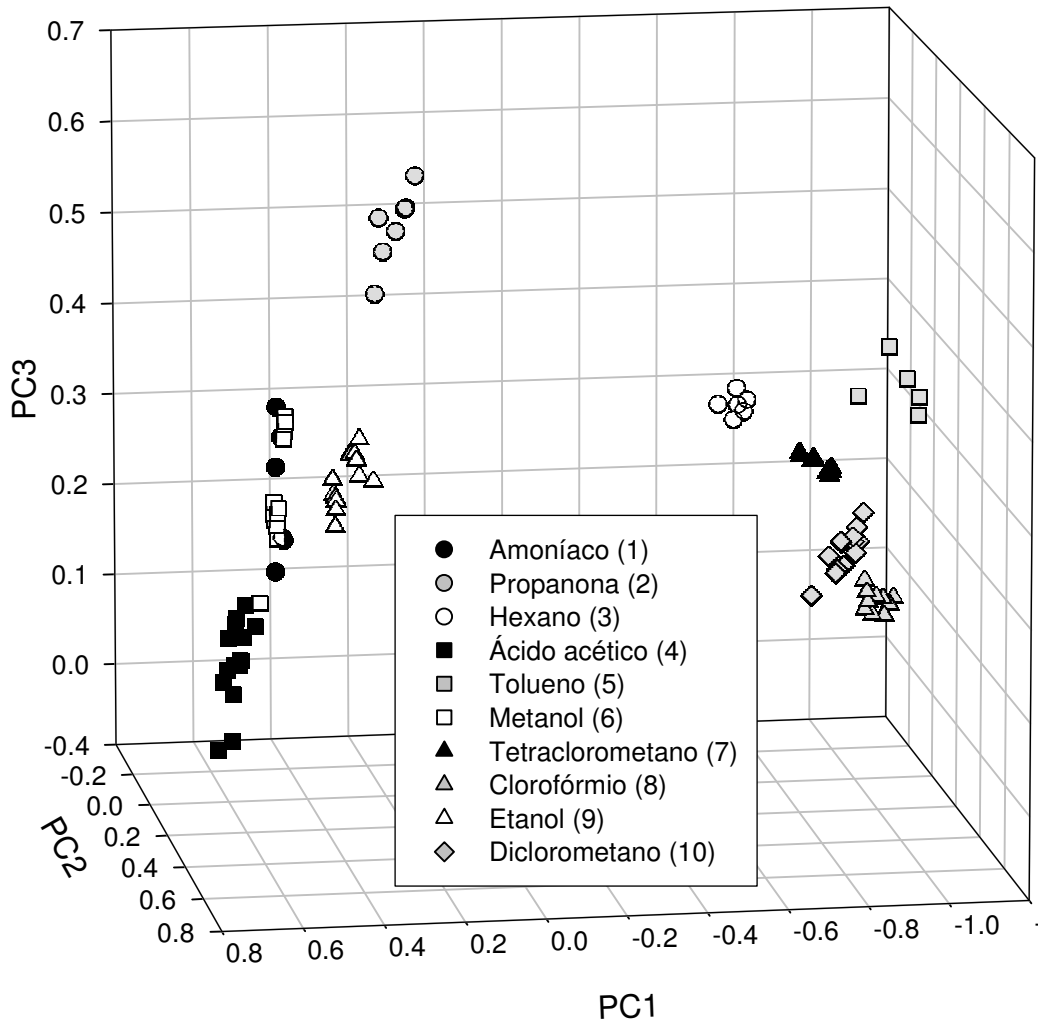


Figura 4.5 – Representação dos dados normalizados através dos três primeiros componentes principais.

Observando o gráfico obtido com os dados normalizados, verifica-se que as amostras aparecem agora agrupadas por composto.

Tabela 4.6 – Vectores próprios obtidos a partir dos dados normalizados e a variância total explicada por cada vector.

	PC6	PC5	PC4	PC3	PC2	PC1
Dithiol	-0.7438	0.1237	-0.5272	0.078	0.1235	-0.3636
Nafion	0.1698	-0.0418	-0.5081	0.5902	0.1979	0.569
Mn_pht	0.352	-0.2089	-0.0346	0.0414	0.7824	-0.4663
PDMS	0.4517	-0.0584	-0.386	0.2286	-0.5612	-0.5256
TMAF	0.085	-0.4877	-0.4909	-0.6828	-0.0246	0.2171
Mg_pht	0.2878	0.8355	-0.2696	-0.3542	0.1336	0.0557
Variância total %	0.2	0.6	2.0	2.4	7.8	87.1

Os grupos estão claramente separados, com a excepção das amostras de amónia e metanol, que aparecem ligeiramente misturadas. Pode-se ainda identificar um grupo do lado esquerdo do gráfico, que engloba as amostras dos compostos mais polares, enquanto os compostos menos polares estão localizados no lado direito do gráfico. Apesar de não permitir a quantificação dos compostos nas amostras, esta rede neuronal foi a mais simples, fácil e rápida de construir. Além disso, possui apenas 4 perceptrões, com um total de 13 neurónios artificiais, e apenas um perceptrão de saída para a identificação.

A tabela 4.7 mostra os resultados obtidos pela rede neuronal quando aplicada ao grupo de teste. Como se pode observar, todos os compostos foram perfeitamente identificados.

Tabela 4.7 – Resultados obtidos na validação da rede neuronal com o grupo de teste. Compostos injectados vs. Composto identificado pela rede neuronal artificial.

Composto injectado	Composto identificado
1	1.0
2	2.0
3	3.0
4	4.0
5	5.0
4	4.0
7	7.0
8	8.0
9	9.0
10	10.0

Apesar de não se poder quantificar com esta rede, devido à normalização que se aplicou, através dos dados não normalizados (sinais obtidos pelos sensores), a sua quantificação pode ser realizada posteriormente. Após identificação do composto presente na amostra pela rede neuronal, a quantificação pode ser obtida através das rectas de calibração determinadas para as amostras de treino, usando o sensor mais sensível de cada composto. Deste modo, podemos quantificar as amostras com uma melhor precisão que nos casos anteriores através da estimativa pelas redes neuronais.

A tabela 4.8 mostra as equações das rectas de calibração dos sensores mais apropriados para cada composto. O decréscimo de frequência (ΔF) está expresso em Hz, enquanto a quantidade de composto injectado (M) está expressa em μg .

Tabela 4.8 – Rectas de calibração obtidas com os sensores mais sensíveis para cada composto testado.

Composto	Equação	Sensor
Amónia	$\Delta F = 8.81 * M + 6.37$ $r = 0.9994$	Nafion
Propanona	$\Delta F = 0.67 * M + 7.98$ $r = 0.9954$	Nafion
Hexano	$\Delta F = 0.51 * M - 1.19$ $r = 0.9998$	PDMS
Ácido Acético	$\Delta F = 1.93 * M + 1.35$ $r = 0.9689$	Nafion
Tolueno	$\Delta F = 0.83 * M - 0.37$ $r = 0.9916$	Mn_pht
Metanol	$\Delta F = 33.35 * M - 0.91$ $r = 0.9897$	Nafion
Tetrachlorometano	$\Delta F = 0.86 * M - 4.39$ $r = 0.9787$	PDMS
Clorofórmio	$\Delta F = 0.64 * M + 1.90$ $r = 0.9911$	Mn_pht
Etanol	$\Delta F = 3.21 * M + 0.55$ $r = 0.9607$	Nafion
Diclorometano	$\Delta F = 0.29 * M + 2.07$ $r = 0.9772$	Mn_pht

4.5. Conclusões

O objectivo deste trabalho, a identificação e quantificação de um composto, de um conjunto de 10 compostos nocivos, libertados no ar de um armazém com $3 \times 3 \times 2,5 \text{ m}^3$, foi completamente alcançado. Este trabalho permite que num futuro próximo os armazéns tenham sistemas de alarme que rapidamente identifiquem e quantifiquem substâncias nocivas que acidentalmente sejam vertidas, permitindo assim maior eficácia da fase de limpeza com os meios de segurança adequados.

A bateria de sensores proposta, associada a um sistema de reconhecimento de padrões baseado em redes neuronais artificiais permitiu uma rápida e correcta identificação, mesmo quando nenhum destes sensores é altamente selectivo para compostos testados. Permitiu ainda, com um pequeno conjunto de sensores, identificar e quantificar os compostos nocivos em número superior ao número de sensores da bateria do nariz electrónico, a partir de um volume de amostra reduzido de 2,5 mL. A aplicação de uma análise em componentes principais tornou possível construir redes neuronais artificiais mais simples, possibilitando uma aprendizagem mais rápida. Normalizando os dados, de modo a que sejam rejeitadas as diferenças causadas pelas variações de concentração, permitiu também a identificação dos compostos com a construção de redes neuronais muito simples. A quantificação neste caso não é imediata, mas continua a ser possível de se realizar através de rectas de calibração do sensor mais adequado para o composto identificado, com a vantagem de se conseguir melhor precisão.

4.6. Referências

- [1] M. Matsuguchi, T. Uno, Sensors and Actuators B, 113 (2006) 94.
- [2] B.J. Doleman, M.C. Lonergan, E.J. Severin, T.P. Vaild, N.S. Lewis, Anal. Chem, 70 (1998) 4177.
- [3] K.T. Lau, J. Micklefield, J.M. Slater, Sens. Actuators B, 50 (1998) 69.

- [4] E.J. Severin, B.J. Doleman, N.S. Lewis, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 658.
- [5] M. T. S. R.Gomes, A. C.Duarte,; J. A. B. P. Oliveira, *Talanta* 1999, 48, 81.
- [6] N. Kasai, I. Sugimoto, M. Nakamura, *Sens. Actuators B*, 65 (2000) 114.
- [7] C. Je, R. Stone, S.G. Oberg, *Sci Total Environ*, 382 (2007) 364.
- [8] I. Sugimoto, T. Nagaoka, M. Seyama, M. Nakamura, K. Takahashi, *Sens. Actuators B*, 124 (2007) 53.
- [9] P. Si, J. Mortensen, A. Komolov, J. Denborg, P.J. Møller, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 223.
- [10] P.E. Keller, R.T. Kouzes, L.J. Kangas, *IEEE Electro/94 International Conference in Boston USA* (1994) 378.
- [11] G.J. Gouws, D.J. Gouws, *Sens. Actuators B*, 91 (2003) 326.
- [12] M. Sriyundthsak, A. Teeramongkolrasasmee, T. Moriizumi, *Sens. Actuators B*, 65 (2000) 358.
- [13] A. Ortega, S. Marco, T. Sundic, J. Samitier, *Sens. Actuators B*, 69 (2000) 302.
- [14] H. Zhang, M.Ö. Balaban, J.C. Principe, *Sens. Actuators B*, 96 (2003) 385.
- [15] A.K. Srivastava, *Sens. Actuators B*, 96 (2003) 24.
- [16] C.W. McCarrick, D.T. Ohmer, L.A. Gilliland, P.A. Edwards, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 4264.
- [17] M. Penza, G. Cassano, *Sens. Actuators B*, 89 (2003) 269.
- [18] F. Despagne, D.L. Massart, *The Analyst*, 123 (1998) 157R.

5. NARIZ ELECTRÓNICO PARA DETECÇÃO DE FRUTA ESTRAGADA

5. NARIZ ELECTRÓNICO PARA DETECÇÃO DE FRUTA ESTRAGADA

5.1. Introdução

O conforto e a tecnologia são parceiros no desenvolvimento de novos aparelhos. Avanços recentes na electrónica em conjunto com os que têm ocorrido noutras ciências, como por exemplo a química, abriram novas possibilidades para o desenvolvimento de novos aparelhos que tornam mais fácil e agradável a vida quotidiana. Recentemente surgiu um novo conceito de casa, onde armários e frigoríficos inteligentes serão uma realidade num futuro próximo.

Um dos aspectos com importância na casa do futuro será a gestão dos alimentos na despensa. Esta tarefa compreende não só a manutenção do stock mas também a detecção de alimentos estragados para serem removidos. A segurança e qualidade alimentar é uma das principais preocupações da actualidade. Os alimentos estragados estão associados a maus odores e têm sérias implicações na saúde do consumidor. O desenvolvimento de um dispositivo para detectar alimentos estragados será uma mais-valia na despensa de uma habitação para fazer a sua manutenção e prevenir o stock de alimentos em más condições.

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver um nariz electrónico para a detecção de fruta estragada, que será aplicado a um conjunto de diferentes variedades de frutas comuns nas casas Mediterrânicas. Existem já vários estudos com narizes electrónicos e frutas, na sua maioria dedicados à medição do aroma de maçãs [2-8] e pêsegos [3, 9, 10]. Existem ainda alguns estudos envolvendo a análise do aroma de melões [13], peras [3], tomates [14] e tangerinas [15]. Estes estudos tinham como principal intenção a determinação do estado de maturação da fruta de modo a estabelecer a altura óptima para a sua colheita. Apesar de terem sido publicados alguns artigos nesta área, ainda não existe uma metodologia capaz de classificar satisfatoriamente o estado de maturação dos frutos. As metodologias existentes, ou têm percentagens baixas de sucesso na classificação dos frutos ou apenas funcionam para uma ou duas variedades de frutas [17]. Nenhum destes estudos avaliou a possibilidade da aplicação dos narizes electrónicos numa despensa como sistema de alerta para a presença de fruta estragada. Apenas E Moltó *et al.* [9] mostraram a existência de uma tendência para os sinais do seu nariz electrónico aumentarem com a presença de 5 % de fruta estragada num armazém de frutas. Além disso, a maioria dos narizes electrónicos usados nestes estudos opera em modo estacionário, o que se traduz em tempos longos de análise, uma vez que é necessário que o sinal do sensor atinja um equilíbrio e nestes casos o facto de abrir a porta do armário ou do armazém origina resultados errados. Neste estudo vamos operar em injeção em fluxo de forma a tornar estas análises mais rápidas e para evitar erros originados por situações como a abertura de portas do armazém.

O aroma das frutas é composto por uma mistura complexa de álcoois, aldeídos, terpenos e principalmente por etileno e ésteres C1-C6 [6, 9, 17]. Sabe-se que durante o amadurecimento de algumas frutas, a concentração de álcoois diminui ao mesmo tempo que aumenta a concentração dos ésteres, atingindo o valor máximo em peras e maçãs maduras [3, 5, 18].

Foi seleccionado um conjunto de revestimentos a serem utilizados como camada sensível dos sensores. Da interacção entre estas substâncias e os

compostos encontrados nos aromas das frutas foi possível então avaliar e estudar as capacidades de discriminação destes filmes sensíveis. O potencial do nariz electrónico como indicador do estado de preservação das frutas numa despensa foi também avaliado. Para classificar as frutas em duas categorias, em fruta comestível e fruta estragada de forma simples e clara, através dos sinais obtidos pelos sensores do nariz electrónico, foi usado um classificador baseado no teorema de Bayes para uma distribuição normal dos dados (descrito no capítulo 2). Neste estudo foram analisadas cinco espécies de frutas diferentes, desde frutas climatéricas (maçãs Starking, maçãs Golden, Kiwi, e peras William) a frutas não climatéricas (laranjas New-Hall).

5.2. Sistema experimental

A figura 5.1 mostra o arranjo experimental usado neste trabalho. Este sistema utiliza a célula de PVC com os sensores dispostos em paralelo (figura 3.13), e o sistema de aquisição Counter/Timer PXI 6608 que permite ler variações de 0,1 Hz. Os cristais de quartzo revestidos com os filmes seleccionados estão alojados dentro da respectiva célula de PVC, por onde passa um caudal de azoto de 8 mL/min regulado por um rotâmetro.

O sistema mostrado no capítulo dois, na figura 3.13, com uma bateria de sensores disposta em paralelo está limitado a injeções de volumes máximos de amostra de 2,5 mL. Este sistema foi modificado para permitir a injeção de amostras maiores sem provocar picos de pressão. Para esse efeito foi adicionado ao sistema uma serpentina de Teflon e uma série de válvulas extra. Este novo sistema está representado na figura 5.1. Cada cristal piezoeléctrico está ligado a um oscilador e a frequência dos seis sensores é adquirida em simultâneo e armazenada num computador em intervalos de 1 segundo.

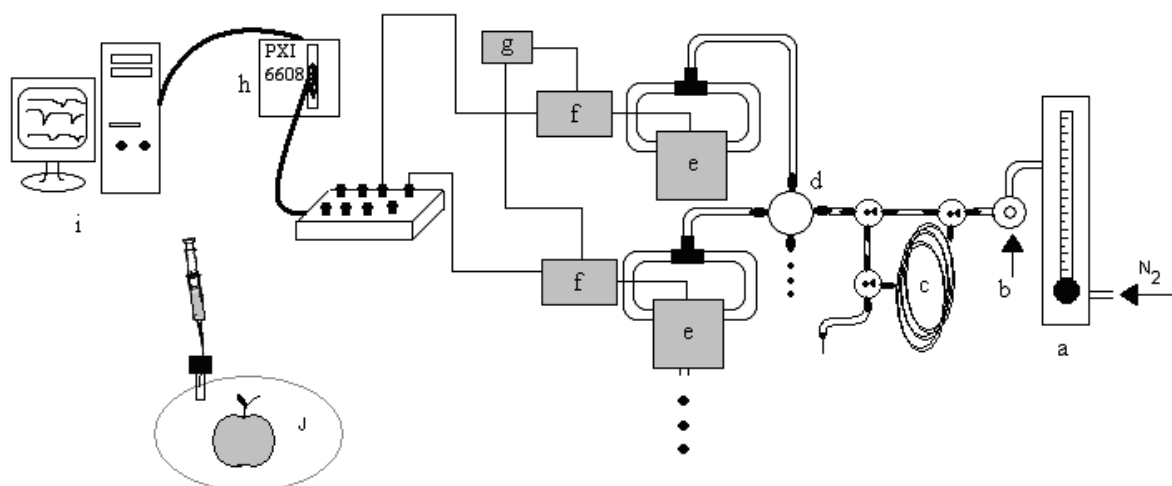


Figura 5.1 – Sistema experimental: a) rotâmetro; b) porta de injeção; c) serpentina para acomodar as amostras; d) válvula de distribuição; e) célula para o cristal; f) oscilador; g) fonte de alimentação; h) contador PXI-6608; i) computador; j) saco de amostragem com septo.

As três válvulas extra controlam o caudal de azoto para permitir a injeção das amostras na serpentina de 6 mL enquanto o caudal de azoto passa pelos sensores. De seguida, estas válvulas foram posicionadas para que o caudal de azoto, por arraste, introduza a amostra do loop no sistema de análise, fazendo-a passar pelos sensores. Este processo tornou possível a injeção de 6 mL de amostra sem provocar picos de pressão.

5.3. Procedimento

Cada peça de fruta foi empacotada individualmente num saco para alimentos, no qual se fez vácuo para retirar o ar do laboratório que poderia estar contaminado com vários solventes. Os sacos foram então posteriormente cheios com ar sintético e armazenados à temperatura ambiente (figura 5.2). Nenhuma amostra foi retirada antes que decorresse o tempo suficiente para se atingir o equilíbrio dentro do saco.



Figura 5.2 – Saco de amostragem das peças de fruta.

Neste trabalho foram revestidas as duas faces de seis cristais piezoeléctricos de 9 MHz de corte-AT através da aplicação dos compostos como descrito no capítulo 3. Os cristais foram revestidos com: Kynar (sensor 1), Nafion (sensor 2), ftalocianina de manganésio (II) (sensor 3), poli(dimetilsiloxano) (sensor 4), Tenax (sensor 5) e trietanolamina (sensor 6). Os sensores revestidos foram então postos a secar durante 24 horas num exsicador e posteriormente inseridos nas células por onde passa um caudal constante de azoto, até a linha de base estabilizar.

O circuito externo de 6 mL do sistema de análise foi cheio com o ar do saco da amostra, com a ajuda de uma seringa de 20 mL. Em seguida, a saída da serpentina foi introduzida no saco através do septo e uma segunda injeção encheu novamente a serpentina com o ar da amostra. Este procedimento teve como objectivo prevenir a contaminação do sistema de injeção com ar do laboratório.

Após a estabilização de todos os sensores com um caudal de arraste constante de 8 mL/min, as amostras foram injectadas abrindo e fechando as válvulas de controlo adequadas. A troca destas válvulas força o azoto a passar pelo sistema de injeção, levando a amostra até ao dispositivo que divide o caudal para todos os cristais e fazendo-a chegar aos seis sensores.

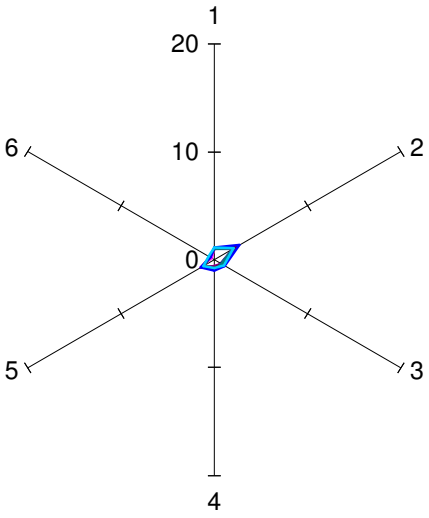
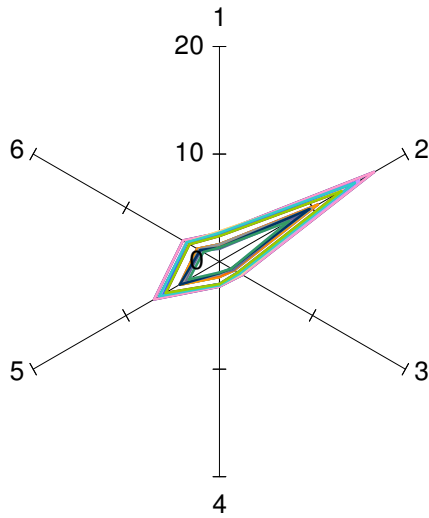
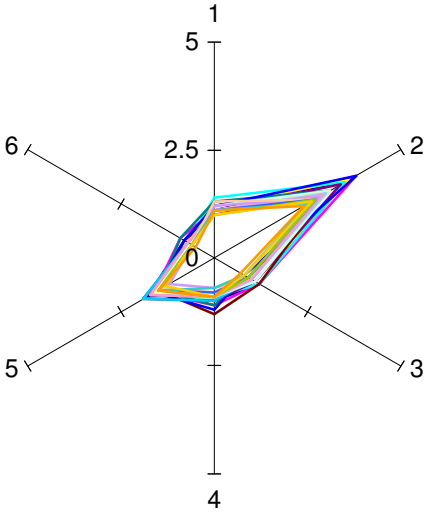
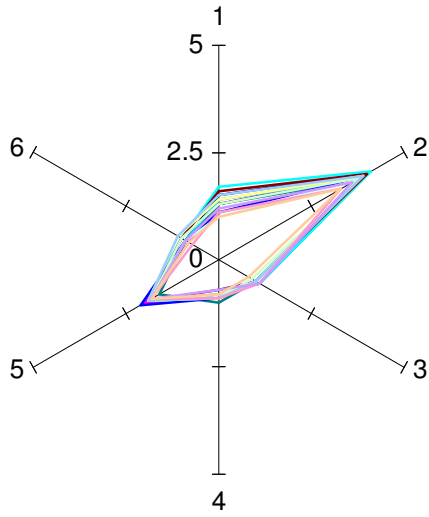
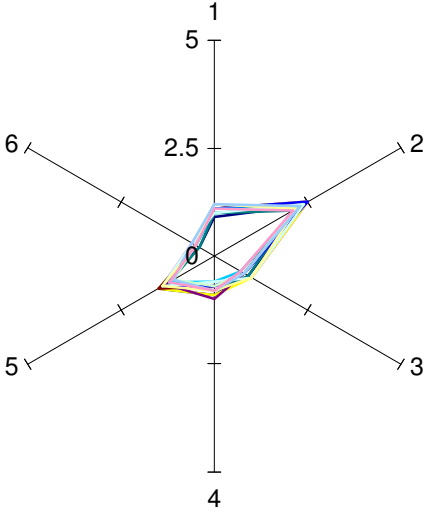
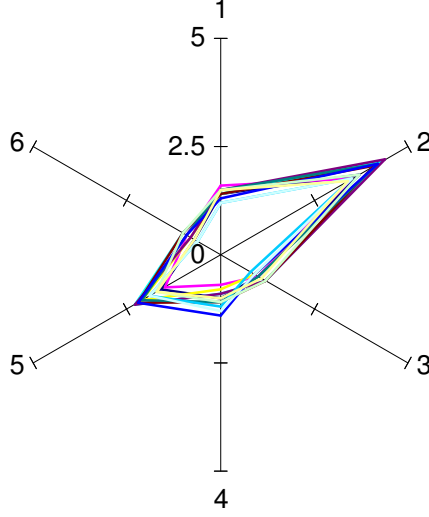
A diferença entre a frequência da linha de base e o mínimo observado após injeção da amostra foi calculada para todos os sensores e usada para posterior tratamento matemático. Antes da introdução de uma segunda amostra, a linha de base foi sempre restabelecida. A completa recuperação da linha de base foi alcançada entre 5 a 10 minutos após a injeção da amostra.

5.4. Resultados e discussão

Para a classificação das amostras foram definidas duas classes de fruta. Classe 1 – fruta comestível – caracterizada por fruta com uma coloração ligeiramente verde ou amarelada, sem defeitos na pele e textura firme; Classe 2 – fruta estragada – caracterizada por fruta com manchas acastanhadas, defeitos na pele e textura mole.

As frutas foram previamente classificadas como comestíveis ou estragadas e só posteriormente analisadas no nariz electrónico. Num total de 136 amostras, foram classificadas 9 laranjas New Hall como comestíveis e 13 como estragadas, 19 maçãs Starking como comestíveis e 12 como estragadas, 12 maçãs Golden como comestíveis e 19 como estragadas, 14 peras William como comestíveis e 12 como estragadas, 14 Kiwis como comestíveis e 12 como estragados.

A figura 5.3 mostra os cinco gráficos radiais obtidos para as cinco variedades de fruta. Os eixos correspondem aos sinais obtidos nos seis sensores para as diferentes peças de fruta.

	Fruta comestível	Fruta estragada
Laranjas New Hall	 <p>a</p>	 <p>b</p>
Maçãs Starking	 <p>c</p>	 <p>d</p>
Kiwis	 <p>e</p>	 <p>f</p>

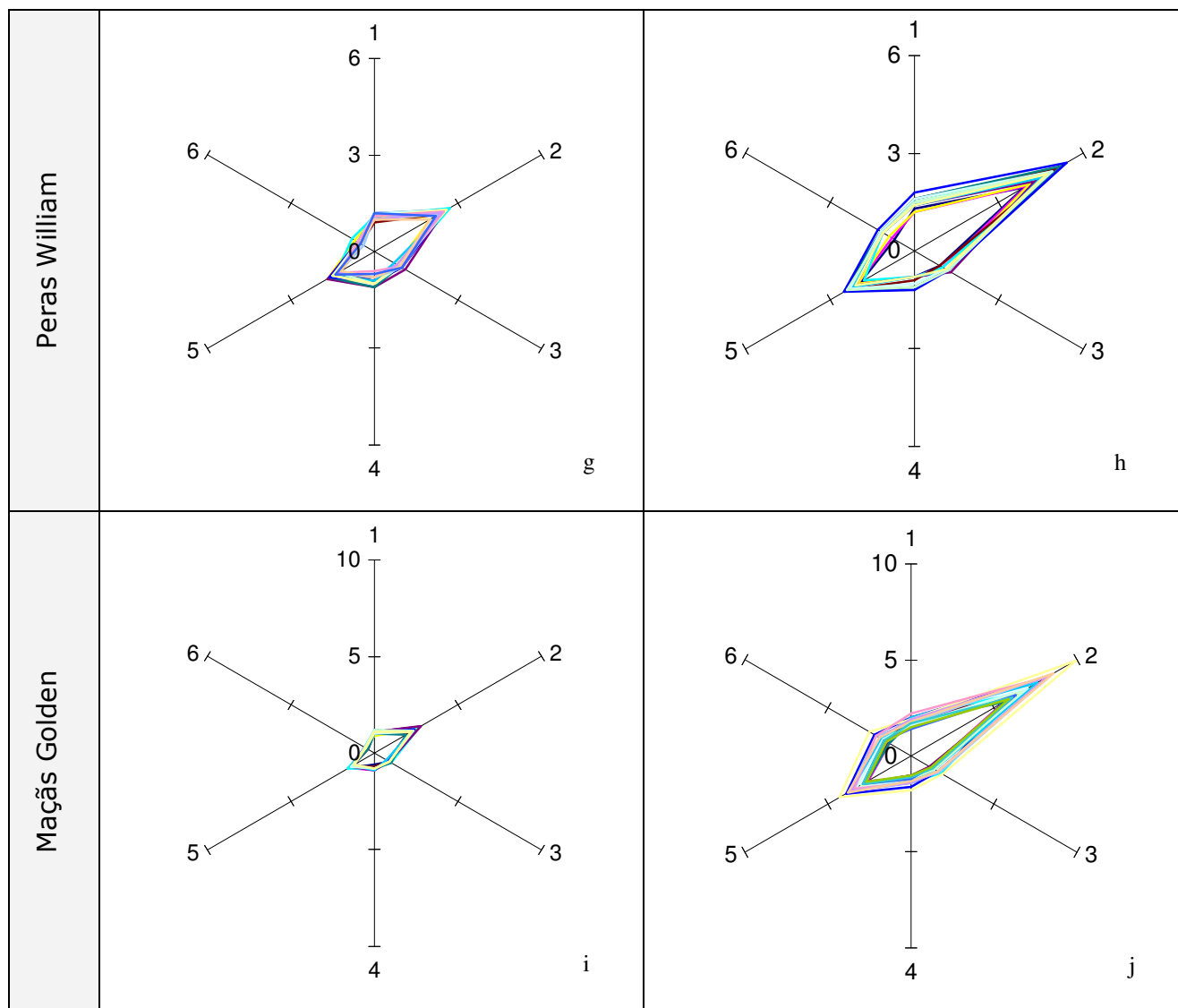


Figura 5.3 – Gráfico radial com os padrões obtidos para as cinco variedades de fruta comestíveis e estragadas analisadas com a bateria de sensores.

Tal como se pode ver existem diferenças significativas nos padrões dos sinais entre fruta comestível e fruta estragada. Estas diferenças foram menos perceptíveis nas amostras de maçã Starking do que para as outras variedades de fruta. Podem-se ver ainda diferenças entre os padrões dos sinais de fruta climatérica (peras William, Kiwis, maçãs Golden e Starking) e fruta não climatérica (laranjas New Hall), tendo estas últimas um padrão com aspecto mais alongado.

Na figura 5.4 podemos observar a aquisição de duas injeções de frutas diferentes no sistema experimental, Pêra William estragada e Laranja New Hall estragada.

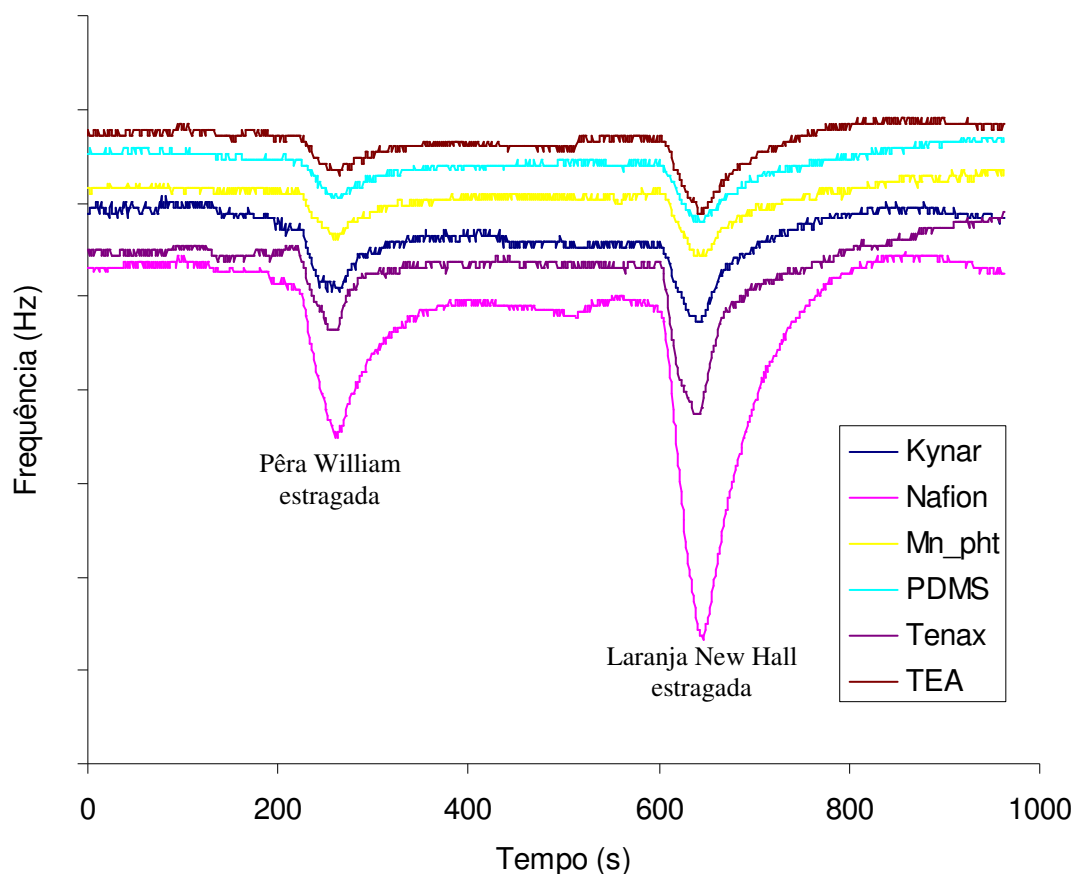


Figura 5.4 – Variações de frequência obtidas no sistema de análise com a injeção de duas amostras de fruta, Pêra William estragada e Laranjas New Hall estragada.

Uma bateria de sensores não selectivos fornece mais informações sobre o aroma das amostras de fruta do que um sensor individual. Porém, um número excessivo de sensores aumenta a complexidade do sistema de análise, introduz informação redundante e origina um conjunto de dados maior e mais difícil de interpretar. Existem várias técnicas de reconhecimento de padrões que podem ser utilizadas de forma a retirar informação útil dos dados obtidos, como por exemplo para identificar os sensores mais importantes da bateria de sensores. O número de cristais a usar na bateria de sensores pode

portanto ser reduzido sem se perder informação útil na análise, o que implica uma diminuição da complexidade do sistema como um todo [4, 14].

A análise em componentes principais (PCs) foi aplicada aos dados para reduzir a sua dimensionalidade e para identificar os sensores mais relevantes na bateria de sensores.

Antes de aplicar qualquer algoritmo matemático deve-se normalizar os dados, uma vez que a magnitude dos sinais dos diversos sensores depende da sua sensibilidade para os diferentes compostos e poderá influenciar a análise dos dados [3]. Deste modo, as variações de frequência, obtidas em cada sensor para cada uma das amostras, foram padronizadas subtraindo a média das variações de frequência obtidas nesse mesmo sensor para todas as amostras e dividindo pelo desvio padrão. Os dados padronizados possuem média zero e desvio padrão 1, e desta forma, variações relevantes devidas ao aroma das frutas não estão condicionadas pelo valor numérico obtido pelo sensor [3].

A tabela 5.1 mostra os coeficientes de correlação obtidos após a padronização dos dados. Pode ver-se que, na maioria, os sensores estão correlacionados entre si, ou seja, os decréscimos de frequência obtidos para as frutas nos diferentes sensores estão correlacionados.

Além disso, os pesos obtidos para o primeiro componente principal foram muito semelhantes para os seis sensores, cerca de 0,4 para cada sensor, e este componente principal representa 92% da variabilidade total dos dados. Estes resultados mostram que qualquer um destes sensores pode ser usado para a classificação das frutas em comestível ou estragada.

Tabela 5.1 – Coeficientes de correlação entre os sensores da bateria utilizada na análise.

	Kynar	Nafion	Fta_Mn	PDMS	Tenax	TEA
Kynar	1	0.8805	0.8688	0.8267	0.8737	0.895
Nafion		1	0.9173	0.8802	0.9916	0.9906
Fta_Mn			1	0.8571	0.9218	0.9247
PDMS				1	0.89	0.8808
Tenax					1	0.9833
TEA						1

A representação gráfica dos dados em duas dimensões foi realizada de duas formas: (i) com os dados obtidos pelos sensores mais sensíveis ao aroma das frutas; (ii) através dos dois primeiros componentes principais.

Era esperado que a representação gráfica com os primeiros componentes principais, que representam a maioria da variabilidade dos dados, fosse mais simples e fácil de interpretar. No entanto, não se verificou nenhuma vantagem real na utilização das combinações lineares dos sensores (PCs). De facto, a separação entre frutas comestíveis e frutas estragadas foi melhor conseguida usando os dados obtidos pelos dois sensores mais sensíveis. Uma possível explicação para o fracasso da representação através dos PCs poderá ser a inclusão de informação confusa e/ou ruído provenientes dos sensores com menor sensibilidade ao aroma das frutas.

Os dois sensores com maior sensibilidade para a detecção do aroma das frutas foram escolhidos através da determinação da distância entre o valor médio dos sinais dos sensores para as frutas comestíveis e o valor médio dos sinais dos sensores para as frutas estragadas. Os dois sensores escolhidos para representar as amostras foram os sensores que geraram a maior distância entre as duas classes de frutas.

Na bateria de sensores testada para estas amostras, os sensores com a melhor capacidade para separar os dois conjuntos de fruta foram os sensores 2 e 5, revestidos com Nafion e Tenax respectivamente.

A figura 5.5 mostra as respostas obtidas com o sensor 2 e o sensor 5 para cada variedade de fruta, bem como para todo o conjunto das variedades de fruta.

Os dados que correspondem às amostras de fruta estragada mostram uma maior variabilidade do que os dados do conjunto das frutas comestíveis, o que está de acordo com os resultados obtidos por Brezmes *et al.* [3], além disso, também observaram uma tendência para um aumento linear dos sinais com a evolução da maturação das frutas.

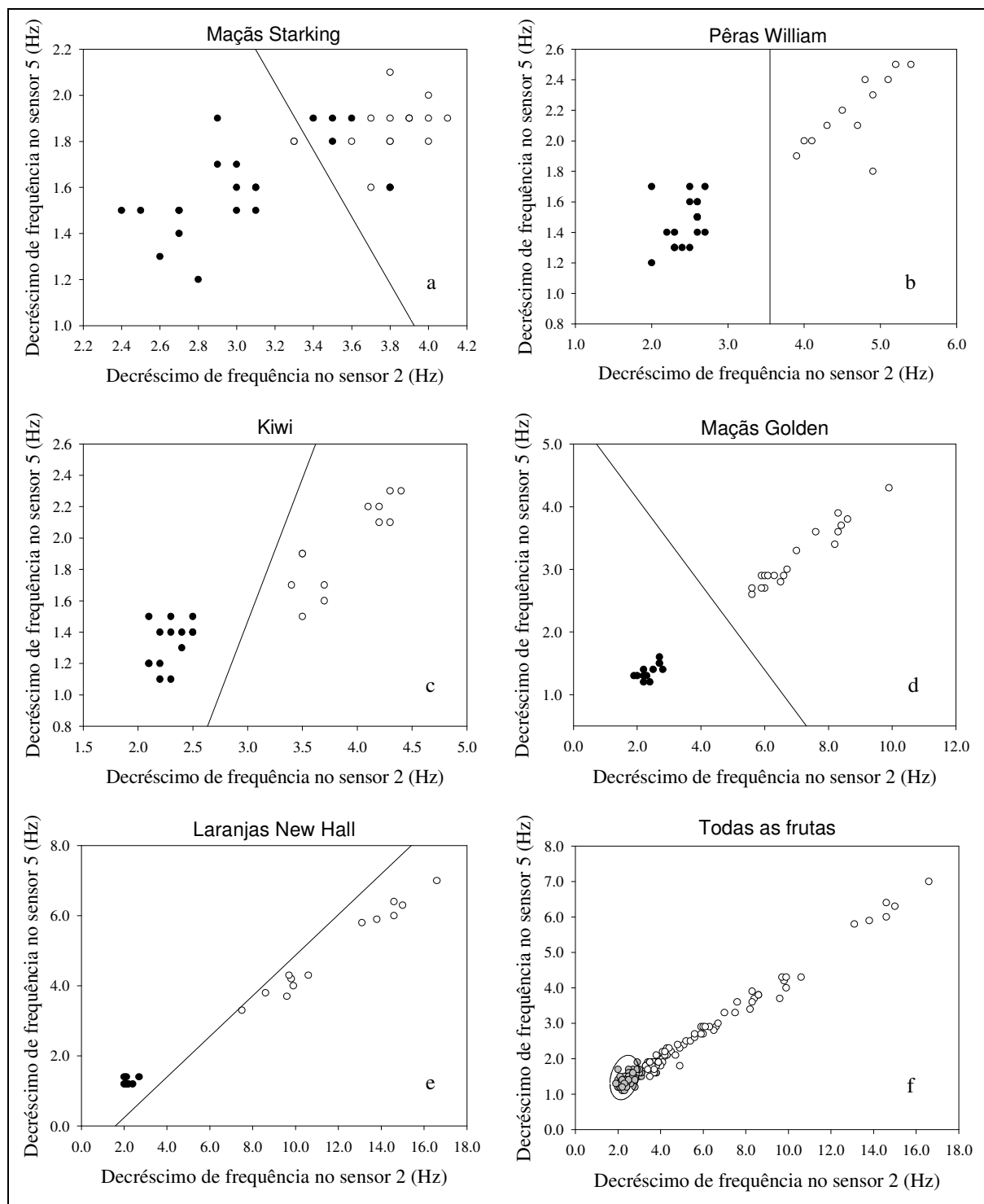


Figura 5.5 – Representação gráfica das amostras para cada variedade de fruta e para todo o conjunto das frutas analisadas através dos sensores 2 e 5, e as respectivas funções discriminantes obtidas. (● fruta comestível, ○ fruta estragada)

Isto deve-se ao processo de amadurecimento que não ocorre ao mesmo tempo para todas as peças de fruta e à quantidade de compostos produzidos que varia de amostra para amostra [3], existindo uma gradação do processo até à podridão completa. Desta forma, dever-se-á esperar uma maior variabilidade nas amostras das frutas estragadas, enquanto no caso das frutas boas não deverá haver muita variabilidade. De facto, como se pode observar na figura 5.5 f) obteve-se um grupo compacto para as frutas comestíveis e um grupo com grande dispersão de dados para as frutas impróprias para consumo.

Como tinha sido previsto anteriormente, através dos coeficientes de correlação, é possível distinguir perfeitamente as duas classes de fruta quando analisamos os dados dentro de cada variedade, com apenas um sensor (neste caso com melhores resultados utilizando o sensor 2). A única excepção ocorreu para as maçãs Starking em que não foi possível separar os dois grupos com nenhum dos sensores.

De forma a representar melhor o sistema que seria necessário para a despesa de uma casa, foi também analisada a capacidade do sistema com os dois melhores sensores para classificar todas as variedades de fruta em conjunto. Observando a figura 5.5,f) os resultados dos sensores 2 e 5 para todas as frutas, permitem classificar as frutas como comestíveis ou estragadas com 95 % de sucesso.

Nenhum dos sensores ou conjuntos de sensores foi adequado para realizar a separação completa das amostras das maçãs Starking, nem mesmo após a utilização dos PCs para separar estas amostras. No entanto, utilizando em conjunto os sensores 4 e 6, revestidos com PDMS e TEA, respectivamente, foi possível classificar estas maçãs com 97,2 % de sucesso. A figura 5.6 mostra graficamente as respostas obtidas do sensor 4 vs. sensor 6 com as amostras das maçãs Starking.

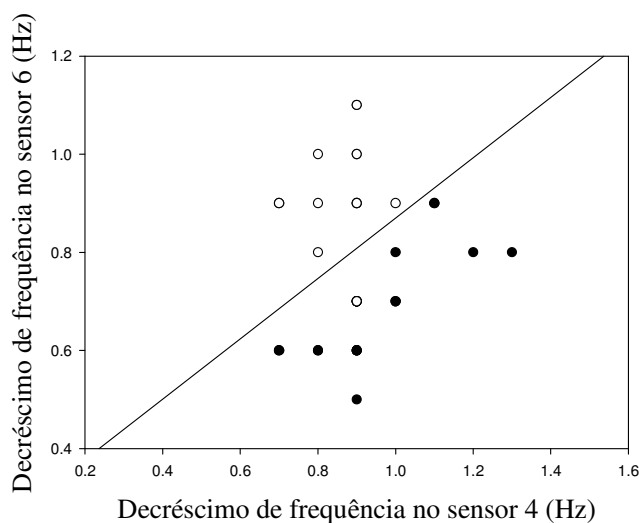


Figura 5.6 – Representação gráfica dos dados das maçãs Starking obtidos através dos sensores 4 e 6, e a respectiva função discriminante. (● fruta comestível, ○ fruta estragada)

Podemos ver que apenas uma maçã estragada foi erradamente classificada como comestível. A maior dificuldade em classificar correctamente as amostras das maçãs Starking pode ter origem nas condições de armazenamento a que estiveram sujeitas. Como as frutas foram adquiridas no supermercado, não existe informação do tempo e das condições de armazenamento. Além disso, estas maçãs foram compradas e estudadas num período fora da sua época natural.

A fim de preservar algumas qualidades das frutas como a firmeza, a acidez e a quantidade de sólidos solúveis, as frutas são muitas vezes armazenadas em atmosferas controladas [6]. Contudo, a produção do aroma das maçãs é drasticamente afectada quando sujeitas a períodos de armazenamento em atmosferas controladas. Este facto deve-se às baixas concentrações de O_2 e/ou altas concentrações de CO_2 , as quais vão afectar a oxidação dos lípidos e o catabolismo dos aminoácidos, levando a uma baixa produção de ésters [6]. De facto as maçãs analisadas eram particularmente inodoras, em contraste com o seu intenso aroma habitual. Esta diminuição do aroma característico das maçãs Starking traduz-se na ausência ou diminuição

da quantidade de alguns compostos voláteis e pode estar na origem da dificuldade sentida em classificá-las.

5.5. Conclusões

O nariz electrónico foi inicialmente desenhado para esta aplicação contendo seis sensores diferentes, escolhidos para responderem à maioria dos compostos presentes no aroma das frutas. No entanto, mostrou-se que a classificação das frutas como comestíveis ou estragadas foi alcançada com melhores resultados com apenas dois sensores (Nafion e Tenax).

Este novo sistema de análise poderá num futuro próximo ser um dispositivo com utilidade numa despensa para cozinha, num restaurante, ou em supermercados, para alertar da presença de fruta estragada. O dispositivo desenvolvido neste trabalho realizou uma análise fácil, rápida e não destrutiva para frutas de diferentes variedades, com 95% de sucesso na discriminação entre fruta comestível e estragada no conjunto das cinco variedades de fruta.

5.6. Referências

- [1] E. Schaller, J.O. Bosset, F. Escher; *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 31 (1998), 305.
- [2] J. Brezmes, E. Llobet, X. Vilanova, J. Orts, G. Saiz, X. Correig, *Sens. Actuators B*, 80 (2001) 41.
- [3] J. Brezmes, M.L. Fructuoso, E. Llobet, X. Vilanova, I. Recasens, J. Orts, G. Saiz, X. Correig, *IEEE Sens. J.*, 5 (2005) 97.
- [4] U. Herrmann, T. Jonischkeit, J. Bargon, U. Hahn, Q. Li, C.A. Schalley, E. Vogel, F. Vögtle, *Anal Bioanal Chem*, 372 (2002) 611.

- [5] S. Saevels, J. Lammertyn, A.Z. Berna, E.A. Veraverbeke, C.D. Natale, B.M. Nicolai, *Postharvest Biol Tec*, 30 (2003) 3.
- [6] S. Saevels, J. Lammertyn, A.Z. Berna, E.A. Veraverbeke, C.D. Natale, B.M. Nicolai, *Postharvest Biol Tec*, 31 (2004) 9.
- [7] M. Zude, B. Herold, J.M. Roger, V.B. Maurel, S. Landahl, *J. Food Eng.*, 77 (2006) 254.
- [8] C. Li, P.H. Heinemann, *Sens. Actuators B*, 125 (2007) 311.
- [9] E. Moltó, E. Selfa, J. Ferriz, E. Conesa, A. Gutierrez, *J. Agric. Engng Res.*, 72 (1999) 311.
- [10] C.D. Natale, A. Macagnano, E. Martinelli, E. Proietti, R. Paolesse, L. Castelaari, S. Campani, A. D'Amico, *Sens. Actuators B*, 77 (2001) 561.
- [11] C. Valero, C.H. Crisosto, D. Slaughter, *Postharvest Biol. Tec.*, 44 (2007) 248.
- [12] S. Benedetti, S. Buratti, A. Spinardi, S. Mannino, I. Mignani, *Postharvest Biol. Tec.*, 47 (2008) 181.
- [13] S.M. Aguirre, A. Yoshino, T. Nakamoto, T. Moriizumi, *Sens. Actuators B*, 123 (2007) 1101.
- [14] M. Penza, G. Cassano, F. Tortorella, G. Zaccaria, *Sens. Actuators B*, 73 (2001) 76.
- [15] A.H. Gómez, J. Wang, G. Hu, A.G. Pereira, *LWT* 40 (2007) 681.
- [16] N. Kasai, I. Sugimoto, M. Nakamura, *Sens. Actuators B*, 65 (2000) 114.
- [17] J. Brezmes, E. Llobet, X. Vilanova, G. Saiz, X. Correig, *Sens. Actuators B*, 69 (2000) 223.
- [18] L.P. Pathange, P. Mallikarjunan, R.P. Marini, S. O'Keefe, D. Vaughan, *J. Food Eng.*, 77 (2006) 1018.

6. SISTEMA ANALÍTICO PARA AVALIAÇÃO DE HALITOSSES ORAIS

6. SISTEMA ANALÍTICO PARA AVALIAÇÃO DE HALITOSSES ORAIS

6.1. Introdução

O ar inalado é constituído aproximadamente por 78% de azoto, 21% de oxigénio, 0,96% de árgon e 0,04% de dióxido de carbono, hélio, água e outros gases. O ar expirado é uma mistura muito mais complexa de compostos e ainda se desconhece o significado bioquímico da maioria deles. No ar expirado podemos encontrar aproximadamente 78% de azoto, 15% a 18% de oxigénio, 4% a 5% de dióxido de carbono, 5% de vapor de água e 0,96% de árgon. Para além destes compostos, podem ainda existir outros com mau odor e em ínfimas concentrações, na ordem de partes por milhão (ppm) a partes por bilião (ppb). Na maioria das halitoses os compostos característicos de doenças orais, como gengivites e periodontites, são compostos de enxofre. No entanto, podem-se encontrar também aminas, associadas a falhas hepáticas ou renais que produzem um cheiro característico a urina ou a peixe, e acetona que pode ser encontrado em pacientes com cetoacidose diabética com um odor característico a maçãs estragadas [1, 2-5].

Outros agentes como tabaco, álcool, alho e especiarias podem provocar o mau odor e podem mascarar a presença dos compostos com origem patológica [4].

O mau hálito afecta um grande número de pessoas e tem implicações na sua vida social. Este é um problema com relevância desde a antiguidade, de tal modo que se podem encontrar referências em textos litúrgicos hebraicos datados de há mais de 2000 anos e nas culturas Grega e Romana. A halitose é o termo geral para descrever qualquer tipo de mau odor no ar expirado, independentemente do composto em causa bem como da sua origem, quer seja oral ou extra-oral [1, 6]. Vários estudos mostraram que aproximadamente 25% dos indivíduos possuíam mau hálito, com níveis de compostos de enxofre acima do aceitável, em algum período do dia [7].

As halitoses são muito difíceis de detectar por autoavaliação, devido ao nariz da própria pessoa ficar saturado com o odor, deixando o indivíduo de o detectar. Pessoas com mau hálito frequentemente não se apercebem deste problema, enquanto outros indivíduos perfeitamente saudáveis permanecem convencidos de que sofrem de mau hálito. Estes últimos casos são designados por pseudo-halitoses ou por halitofobia [7]. O método correntemente utilizado para validação da halitose consiste na utilização de um painel de juízes treinados para classificar a intensidade do odor do hálito. Esta análise é subjectiva e apenas um método instrumental será capaz de classificar a intensidade do odor de um modo objectivo e rigoroso.

A ocorrência do mau odor pode ter origem em vários distúrbios de saúde, o que torna importante a sua detecção e avaliação [1]. Desde muito cedo, os médicos sabiam desta relação entre o odor e uma determinada doença, tanto mais que o diagnóstico passava pela avaliação do hálito dos pacientes [2]. Além disso, é de realçar que as análises ao ar expirado são indolores e não-invasivas para o paciente e que qualquer informação que se possa obter pode ser útil para um diagnóstico médico.

As halitoses podem ser classificadas como halitoses verdadeiras ou como pseudo-halitoses. As halitoses verdadeiras são classificadas como orais ou extra-orais, o que está relacionado com a proveniência do problema. Na tabela 6.1 encontra-se um sistema de classificação das

halitoses. Na maioria dos casos as halitoses derivam da cavidade oral e podem ser eficientemente tratadas. Contrariamente, as halitoses extra-orais podem ser uma manifestação de uma doença com alguma gravidade e normalmente o tratamento é mais complicado [1, 7, 8].

Tabela 6.1 – Classificação das Halitoses [7, 9].

Classificação	Descrição
I. Halitoses verdadeiras	Mau hálito óbvio. É perceptível com uma intensidade além do nível socialmente aceitável.
I.a. Fisiológicas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Surgem por processos de putrefacção dentro da cavidade oral. Não se verifica a existência de nenhuma doença específica, nem condição patológica. 2. Têm origem principalmente na região dorsal posterior da língua. 3. Podem ser temporárias, devido a factores dietéticos (ex: alho)
I.b. Patológicas	
(i) Oral	Causadas por doenças patológicas orais, ou pelo mau funcionamento de tecidos orais, como doenças periodontais, xerostomia, etc.
(ii) Extra oral	Com origem na região da laringe, nasal e/ou paranasal, na área pulmonar ou área digestiva superior e em desordens de qualquer lugar do corpo com excepção da boca. Os compostos responsáveis pelo mau hálito são acumulados no sangue e emitidos pelos pulmões durante a respiração. Exemplos de distúrbios que originam halitoses extra orais são: diabetes, cirroses hepáticas, uremia, hemorragias internas, etc...).
II. Pseudo-halitoses	O paciente obstinadamente reclama da sua existência, sem razão.
III. Halitofobia	Não existe nenhuma evidência física que sugira a presença de uma halitose. Após tratamento para halitoses verdadeiras ou pseudo-halitoses, o paciente persiste na crença de que continua com a halitose.

Outra causa de halitose é a redução do fluxo da saliva durante o sono que origina um aumento do mau hálito, mas que é uma condição transitória desaparecendo após a refeição. Nestes casos existe uma razão fisiológica para que isso aconteça. Durante o sono, o fluxo de saliva é drasticamente reduzido e a língua move-se muito pouco. Isto permite que os resíduos de comida fiquem estagnados e que as células mortas se acumulem favorecendo a putrefacção bacteriana anaeróbia. Esta é uma condição denominada "hálito matinal" [1, 7, 8].

A figura 6.1 mostra alguns compostos responsáveis pelo mau hálito que estão associados a determinadas doenças e a sua origem.

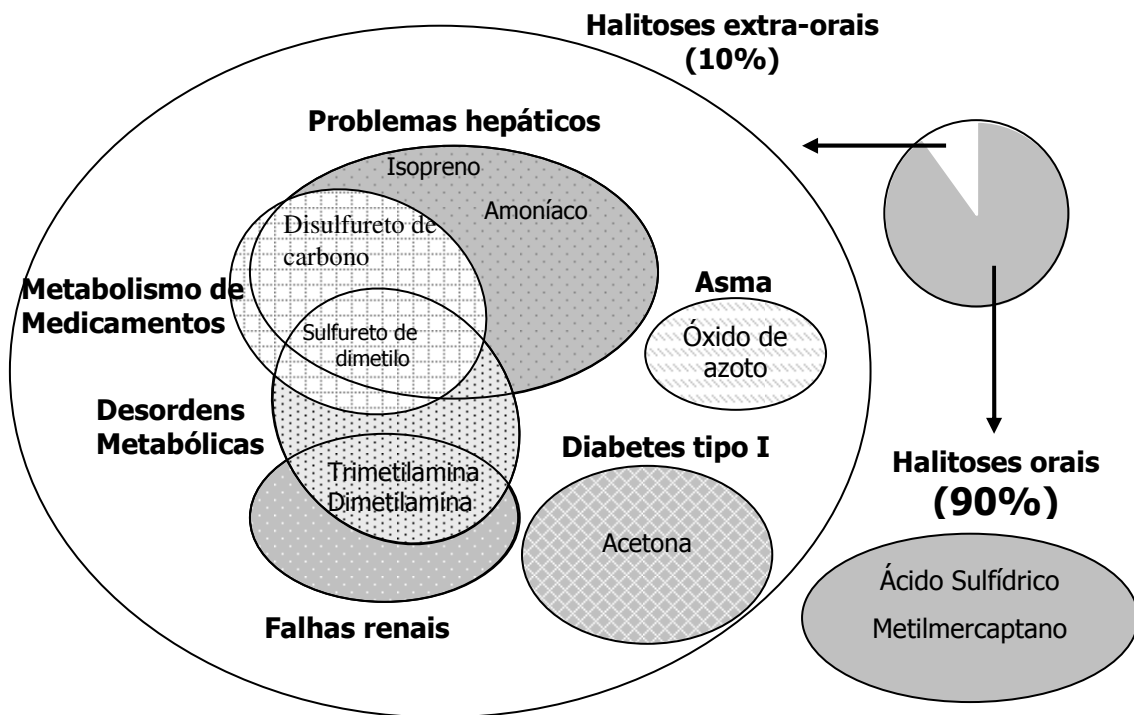


Figura 6.1 – Compostos mais relevantes encontrados no hálito e a sua proveniência.

Como podemos observar, 90 % das halitoses têm origem oral e os compostos responsáveis pelo mau odor são o sulfureto de hidrogénio e o metilmercaptano. Estes compostos são produzidos por bactérias anaeróbias, principalmente gram-negativas, existentes na cavidade oral que degradam

os aminoácidos contendo grupos de enxofre, como a cistina, a cisteína e a metionina. As cáries, por si só, não são um factor etiológico de mau odor, a menos que a lesão seja suficientemente grande para reter alimentos em estado de decomposição [8].

Para além da presença de bactérias gram-negativas anaeróbias, são necessárias certas condições físico-químicas para a produção dos gases odoríferos, como o pH e nível de oxigénio (pO_2). Se as fontes de nutrientes principais forem hidratos de carbono, em vez de proteínas, a fermentação dos hidratos de carbono torna o pH do meio ácido e a formação de compostos voláteis de enxofre é inibida. Contudo este ambiente ácido degrada o esmalte dos dentes [7].

O sulfureto de hidrogénio possui um odor extremamente desagradável, característico dos ovos podres, e o nariz humano consegue detectá-lo em concentrações muito pequenas (250 ppb (v/v)) [6]. Todavia, a detecção instrumental destes compostos nestas concentrações é muito difícil de realizar e os métodos usuais, como cromatografia gasosa (GC) com detector de fotometria de chama ou com um detector de quimoluminescência de enxofre são métodos que necessitam de equipamentos muito caros e de técnicos especializados [6]. Por tudo isto, as análises organolépticas realizadas por um painel de juízes treinados continuam a ser o método padrão, mesmo sabendo que existe variabilidade entre os juízes e que a análise é subjectiva.

Surgiram nos anos 90 instrumentos financeiramente mais acessíveis e fáceis de usar, para a medição de compostos de enxofre voláteis chamados Halímetros. No entanto, estes dispositivos medem os compostos de enxofre totais no hálito, detectam o H_2S e o metilmercaptano com sensibilidades diferentes e são sensíveis a outros gases interferentes presentes em elixires, em bebidas alcoólicas, no fumo de tabaco e ao vapor de água. Apesar de haver alguma correlação entre os dados dos halímetros e os da cromatografia gasosa, o método escolhido para análise dos

compostos de enxofre continua a ser a cromatografia gasosa devido à sua maior precisão e a exactidão dos resultados [1, 10].

Neste trabalho desenvolveu-se um sistema analítico baseado nos cristais de quartzo piezoeléctricos para detectar H_2S no hálito, de forma a diagnosticar gengivites e periodontites.

Para além do desenvolvimento do sensor, existem outros problemas associados à análise do hálito. O primeiro consiste em projectar equipamento para a recolha das amostras. Como é óbvio, é difícil expirar para algo que ofereça resistência, especialmente tratando-se de pessoas idosas ou acamadas. Além disso, a recolha não pode representar qualquer perigo de contaminação para o paciente e deverá por isso ter peças descartáveis. Outro problema prende-se com a quantidade de água existente em estado de vapor nas amostras, que pode por um lado complicar a análise e por outro ser também um factor que propicia a perda de alguns compostos por dissolução [2].

Para evitar contaminações das amostras os pacientes devem cumprir alguns procedimentos. Alguns autores recomendam aos pacientes a interrupção dos tratamentos com antibióticos alguns dias antes da amostragem, a evitarem comer ou beber algumas horas antes da recolha do ar, a não usarem cosméticos e a não fumar [7, 9, 11].

Para a detecção do H_2S , e dentro de um conjunto de substâncias que interagem com este gás, foi escolhido como revestimento para o sensor de massa o composto mais sensível e estável. Este revestimento determina, para além da sensibilidade, também a selectividade do sensor. Como as amostras de hálito são uma mistura complexa de diversos compostos e o limite de detecção necessário para a detecção do H_2S no hálito é muito baixo, foi necessário incorporar uma unidade de pré-concentração, que tem ainda a função de eliminar interferentes do sistema analítico.

Para a construção da unidade de pré-concentração foram estudados vários compostos, no sentido de se escolher um bom adsorvente para incorporar na coluna. O adsorvente ideal terá de ser eficiente em concentrar o H_2S e, se possível, não adsorver os interferentes no ar expirado, principalmente o CO_2 e o vapor de água que se encontram em quantidades elevadas. Habitualmente, nas colunas de pré-concentração, utilizam-se como adsoventes peneiros moleculares, resinas ou polímeros, que adsorvem a amostra à temperatura ambiente ou a temperaturas negativas, e os libertam posteriormente por aquecimento da coluna num forno. Existem outros métodos usados correntemente para a concentração de amostras gasosas, como a captura por processos criogénicos, usando um tubo em U e um fluído criogénico como azoto líquido; captura por condensação, igual ao anterior mas com temperaturas baixas mas moderadas, conseguidas usualmente com gelo, e sistemas químicos de captura, em que se usam solventes para capturar o composto pretendido [2, 12]. Todos estes métodos têm vantagens e desvantagens e a sua aplicação depende, entre outros aspectos, da sensibilidade e selectividade do sensor e da matriz da amostra. O método escolhido para analisar o hálito foi uma combinação de captura por condensação e por adsorção.

6.2. Sistema experimental

Para o estudo dos revestimentos foi usado o sistema experimental com célula de vidro referido no capítulo 3, representado na figura 3.2. As curvas de calibração para o H_2S para cada um dos sensores foram obtidas neste sistema e a partir delas foram determinadas as sensibilidades e os limites de detecção. O estudo das selectividades do sensor escolhido para a análise ao H_2S foi também realizado neste sistema experimental, com célula de vidro.

O sistema experimental usado para a análise do H_2S no ar expirado foi baseado no sistema optimizado referido no capítulo 3 com célula de PVC que se encontra representado na figura 3.10. Este sistema novo possui uma

unidade extra de pré-concentração para o H_2S e uma membrana de Nafion para retirar a água do sistema. A figura 6.2 mostra o sistema experimental usado para a análise do H_2S no ar expirado, com a unidade de pré-concentração representada dentro do quadrado a tracejado.

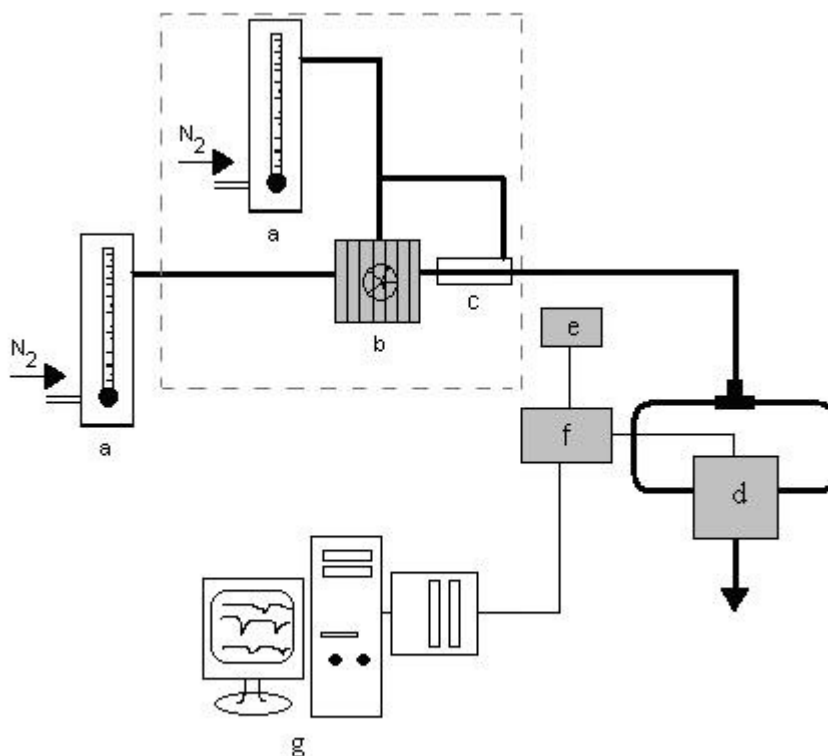


Figura 6.2 – Sistema experimental com células de PVC e com unidade de pré-concentração para a análise do H_2S no ar expirado: a) rotômetro, b) unidade de pré-concentração, c) membrana de Nafion, d) célula de PVC, e) fonte de alimentação, f) oscilador com circuito divisor, g) computador com sistema de aquisição PXI-6608.

Este sistema novo também funciona em fluxo de azoto, regulado por um rotômetro principal para 10 mL/min e possui apenas uma célula de PVC. O sensor seleccionado foi ligado ao oscilador com o divisor de frequência. A aquisição da frequência foi realizada com o Counter/Timer Device PXI 6608, da National Instruments, em intervalos de 1 segundo. A unidade de pré-concentração possui uma segunda linha de azoto utilizada para regenerar a coluna de pré-concentração e para alimentar o circuito externo da membrana secante de Nafion. A unidade de pré-concentração possui uma

porta de injeção para a introdução das amostras e um conjunto de válvulas para redireccionar os fluxos de azoto quando se pretende proceder à dessorção e introdução das amostras no sistema de análise. Na coluna de pré-concentração encontra-se enrolada uma resistência de aquecimento e em seu redor um sistema Peltier de arrefecimento. Existe ainda uma coluna de cloreto de cálcio anidro entre a porta de injeção e a coluna de pré-concentração, para secar a amostra antes de ser concentrada na coluna.

A figura 6.3 mostra em detalhe a unidade de injeção e pré-concentração das amostras.

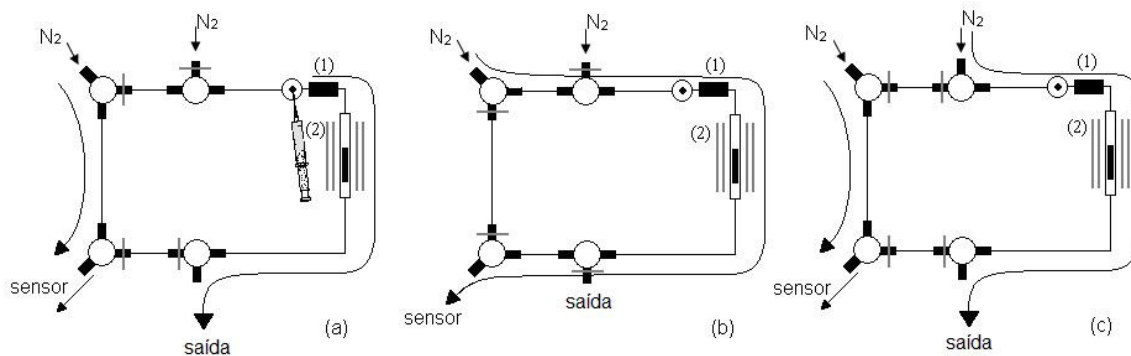


Figura 6.3 – Sistema de injeção e unidade de pré-concentração com indicação da direcção dos gases nos vários passos da análise: a) pré-concentração, b) dessorção e análise, c) eliminação da água e regeneração da coluna.

Na recolha das amostras de ar expirado dos pacientes foi utilizado um sistema de captura por condensação representado na figura 6.4. Este sistema é constituído por um tubo de aço inox de 0.5 cm diâmetro interno em forma de U e foi mergulhado numa mistura frigorífica, para retirar a maior parte do vapor de água das amostras. Este tubo encontrava-se ligado ao saco de Tedlar e possuía uma peça de polietileno descartável por onde o paciente soprava.

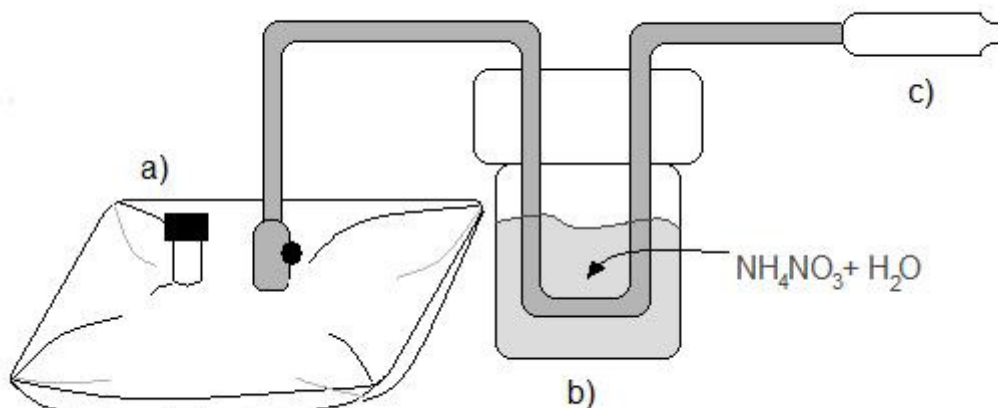


Figura 6.4 – Sistema de amostragem: a) saco de amostragem de Tedlar, b) copo contendo a mistura frigorífica, c) bocal de polietileno.

6.3. Procedimento

6.3.1. Caracterização dos sensores

Foram estudados 10 revestimentos diferentes sensíveis ao H_2S . Os cristais de quartzo foram revestidos pelos métodos referidos no capítulo 3 através de um “spin coater”, por “spray” ou pela adição de uma gota da solução do revestimento com micropipeta. Os compostos testados como camada sensível do cristal piezoelétrico foram: poli(isopreno), Nafion, Mn_pht, Kynar, Tenax, PDMS, TEA, Mercapto hexanol, Mg_pht, TMAF.

Os sensores foram avaliados para a detecção de H_2S injectando diversas concentrações de H_2S no sistema com célula de vidro. Foi obtida uma curva de calibração e determinado o limite de detecção ao H_2S para cada sensor. O revestimento com maior sensibilidade e o menor limite de detecção foi o sensor escolhido para as análises ao ar expirado.

6.3.2. Preparação dos padrões gasosos de H₂S

O H₂S foi gerado pela adição de ácido sulfúrico 50% (v/v) ao sal de sulfureto de sódio num frasco apropriado. Este frasco continha o sal e possuía um funil de carga para o ácido sulfúrico que era adicionado gota a gota. O H₂S foi recolhido depois de seco por uma coluna de cloreto de cálcio, através de uma pêra de vidro com um septo [13].

Num saco de Teflon de 1 L foram injectados 10 mL do H₂S gerado, tendo sido posteriormente adicionado azoto até perfazer aproximadamente 1 L. A concentração final obtida rondava os 10000 ppm. Este saco foi padronizado através de uma titulação iodométrica, em que se utilizaram alíquotas de 30 mL do gás do saco. A amostra de 30 mL do saco foi injectada num frasco com septo contendo aproximadamente 20-30 mL de NaOH 0,02 M, para a captura do H₂S. Esta solução foi posteriormente titulada iodometricamente [14], tendo a solução de tiosulfato de sódio sido adicionada por meio de uma microbureta. Os padrões de concentração mais baixa de H₂S usados para obter as curvas de calibração, desde 100 ppb a 2 ppm, foram obtidos por diluição do H₂S do saco inicial com azoto num segundo saco e finalmente por diluição na seringa a partir de alíquotas do saco de concentração intermédia.

6.3.3. Preparação das colunas de pré-concentração

As colunas de pré-concentração foram preparadas com tubos de vidro de 20 cm de comprimento, 8 mm o.d., 2.2 mm i.d, com cerca de 2-3 cm de composto adsorvente, com lã-de-vidro silanizada em ambas as extremidades. Os compostos adsorventes testados neste trabalho, para concentrar o H₂S em amostras de hálito, foram os adsorventes Tenax TA, carvão activado e os peneiros moleculares ETS4 e MS-5A.

As colunas de carvão activado e de MS-5A foram acondicionadas antes de qualquer aplicação, aquecendo a 250° C pelo menos durante 4 h,

na presença de um caudal de azoto, para dessorver qualquer contaminante que pudesse conter. As colunas de Tenax e de ETS4 foram acondicionadas durante 4 h mas a 200°C.

6.3.4. Amostragem

As amostras foram recolhidas de pacientes que frequentavam as consultas do Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial da FMUC, supervisionadas pelo Doutor Tony Rolo. A recolha de amostras não requer qualquer preparação prévia nem foi necessária a administração de qualquer substância ao paciente e não existem riscos ou incómodos causados aos doentes pelo estudo.

Os pacientes apenas tinham de cumprir algumas recomendações, tendo sido aconselhados a não comerem ou beberem algumas horas antes da amostragem, a não ingerir café e a não fumarem.

A amostragem do ar expirado foi feita para um saco de Tedlar com um septo e uma válvula. Este saco foi acoplado a um tubo inox em forma de U imerso numa mistura frigorífica de nitrato de amónio com água na proporção de 1:1. Este tubo remove eficientemente grande parte do vapor de água das amostras por condensação, durante o processo de amostragem, para evitar que se forme um filme de água dentro do saco de Tedlar e para reduzir o sinal de água na análise. O tubo de aço-inox em forma de U está ligado a um tubo de polietileno com 0,5 cm i.d. descartável pelo qual as pessoas sopram. Tanto o tubo inox como o tubo de polietileno são suficientemente largos para que os pacientes não necessitem de fazer esforço para soprarem durante a amostragem.

Uma vez que se trata de voluntários com doenças periodontais, o ar da cavidade bucal é de extrema importância e por esse motivo todos eles ficaram um período de 3 a 5 minutos com a boca fechada, respirando

apenas pelo nariz. Após este tempo, os pacientes encheram o respectivo saco de amostragem de aproximadamente 1 L.

6.3.5. Análise das amostras de hálito

As amostras foram analisadas no próprio dia da recolha, para evitar perdas ou contaminações da amostra através do saco. De igual modo, a curva de calibração foi obtida nesse mesmo dia. A coluna de pré-concentração foi acondicionada a 250° C, antes de qualquer injeção e também entre as amostras ou padrões. A coluna de cloreto de cálcio anidro foi trocada todos os dias antes de iniciar as análises, para evitar perdas de H₂S por dissolução na água capturada pelo cloreto de cálcio anidro.

A primeira fase da análise consistiu em arrefecer a coluna de pré-concentração a 5-8° C com um jacto de ar refrigerado pelo dispositivo de Peltier, para permitir a adsorção dos compostos na coluna. A manutenção da temperatura de adsorção com o sistema Peltier evita que a capacidade de adsorção da coluna varie de amostra para amostra. Após arrefecer a coluna foi injectada uma amostra de 400 ml através da porta de injeção, e o H₂S foi pré-concentrado na coluna (figura 6.3 a). Durante este processo existe um caudal constante de 10 mL/min de azoto a passar pela célula do sensor. De seguida, quatro válvulas de 3-vias foram usadas para redireccionar o caudal de azoto obrigando-o a passar pela coluna de pré-concentração. A dessorção da amostra do carvão activado foi realizada termicamente a 250° C ligando uma resistência eléctrica de aquecimento que se encontra enrolada à coluna (figura 6 b). Após ligar o forno, observou-se um decréscimo de frequência do sensor, devido ao H₂S. Atingido o mínimo da frequência e após o início da recuperação do sensor, as válvulas foram novamente redireccionadas para desviar para o exterior a água que tinha sido concentrada na coluna e para permitir a regeneração da coluna de pré-concentração (figura 6 c). Em todas estas fases, durante a troca das válvulas, foi necessário manter sempre o sensor ligado ao caudal

principal de azoto, para não provocar variações de frequência devido a alterações de caudal.

O sinal analítico foi determinado a partir da diferença entre a frequência do cristal de quartzo observada antes do aquecimento da coluna e a frequência mais baixa observada após esse mesmo aquecimento para a dessorção do H_2S .

6.4. Resultados e Discussão

A tabela 6.2 mostra os limites de detecção obtidos com os diferentes cristais revestidos, usando o sistema experimental com as células de vidro (figura 3.2). Os sensores revestidos com TEA e TMAF foram os sensores que mostraram os melhores resultados na detecção do H_2S , tendo ambos o mais baixo limite de detecção ($3 \mu\text{g}$ de H_2S) e as mais altas sensibilidades para o analito ($1,68 \text{ Hz}/\mu\text{L}$ para o sensor TMAF e $1,42 \text{ Hz}/\mu\text{L}$ para o sensor TEA). Os dois sensores foram revestidos com quantidades de composto que produziram um decréscimo de frequência dos cristais piezoeléctricos semelhante ($\approx 13 \text{ kHz}$).

O sensor seleccionado foi o TEA por ter um revestimento menos higroscópico e porque o sinal do sensor TMAF é muito mais complexo e altamente dependente da temperatura [13].

Tabela 6.2 – Limites de detecção para o H₂S obtidos para os diferentes sensores.

	Limite de detecção (µg H ₂ S)
Poli(isopreno)	284
Nafion	731
Mg_pht	812
Kynar	417
Tenax	62
PDMS	739
TEA	3
Mercapto hexanol	1525
Mn_pht	350
TMAF	3

Como o hálito é uma mistura complexa de substâncias, o sensor TEA foi testado com outros compostos que podem ser encontrados no hálito e agir como interferentes. A figura 6.5 mostra os coeficientes de selectividade obtidos para os diferentes compostos testados com o sensor TEA. O coeficiente de selectividade é aqui definido como a razão entre a quantidade de composto interferente e a quantidade de H₂S necessária para produzir um sinal analítico de 15 Hz. Como se pode observar, apenas se obtiveram valores de coeficientes de selectividade próximos de 1 para os compostos interferentes NH₃ e TMA. Contudo, o sensor foi ainda mais selectivo para o NO e o NO₂ do que para o H₂S.

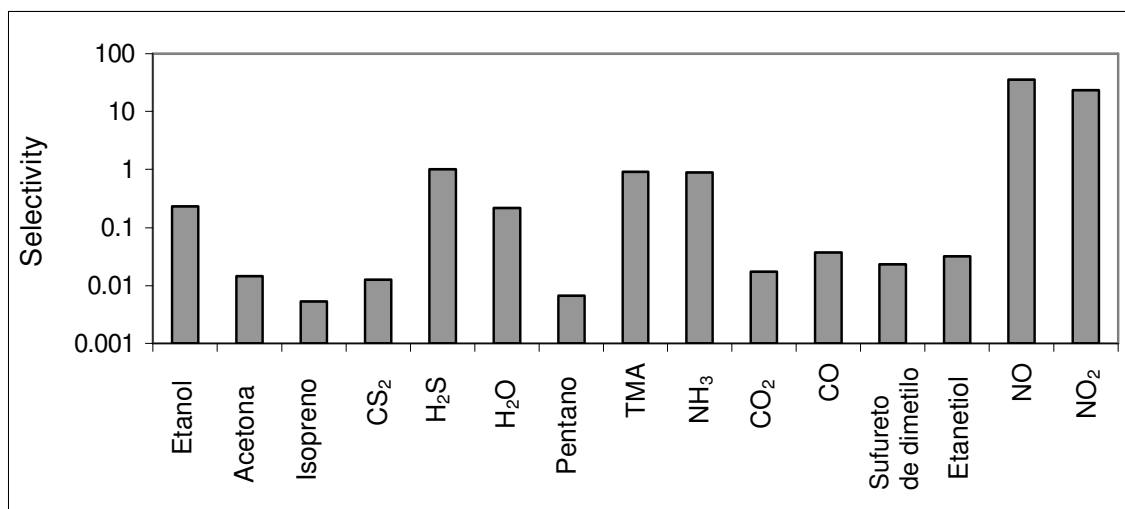


Figura 6.5 – Coeficientes de selectividade obtidos para os diferentes compostos encontrados no ar expirado.

Com o sensor escolhido e o novo sistema de análise otimizado representado no capítulo 3 na figura 3.10, com as células de PVC, foi obtido um novo limite de detecção. Foi possível, com este novo sistema experimental, aumentar a sensibilidade do sensor TEA na detecção do H₂S de 1,42 Hz/μL ($r = 0,998$ e ΔF de revestimento = 13,7 kHz) para 11,54 Hz/μL ($r = 0,997$ e ΔF de revestimento = 11,3 KHz) e reduzir o limite de detecção de 3 μg para 27 ng. As alterações efectuadas ao sistema baixaram o limite de detecção em 100 vezes, em relação ao sistema antigo com células de vidro, devido ao aumento da sensibilidade em 10 vezes e no aumento na resolução da leitura da frequência em 10 vezes (de 1Hz para 0,1 Hz).

No entanto, mesmo com estas alterações, a análise do H₂S no hálito permanece impossível. No sistema novo o volume de amostra máximo que era possível injectar era de 2,5 mL. Um limite de detecção de 27 ng (20 nL de H₂S) e um volume máximo de 2,5 mL de amostra, apenas permitem a detecção de concentrações acima de 8 ppm (v/v) de H₂S.

Para resolver este problema foi introduzida uma coluna de pré-concentração para permitir a análise de volumes de amostra muito maiores.

Foram estudados quatro compostos adsorventes diferentes para a coluna: Tenax, MS-5A, ETS4 e carvão activado.

O adsorvente Tenax foi descrito como sendo um bom composto para capturar o H_2S [15], no entanto necessita de temperaturas muito baixas (azoto líquido) para funcionar. Isto mostrou ser um problema para amostras de hálito, devido à grande quantidade de água e de dióxido de carbono contidas nestas amostras, que também são capturados e concentrados. Além disso, o Tenax desorve o H_2S à temperatura ambiente, o que causa perdas de H_2S no processo de transferência da coluna de Tenax do Dewar para o sistema.

O peneiro molecular MS-5A é um composto adsorvente mais selectivo e foi referido como um bom composto para capturar o H_2S à temperatura ambiente [16]. Contudo, este composto mostrou ser mais selectivo para a água e também adsorve dióxido de carbono, os dois compostos interferentes mais importantes a retirar.

Na figura 6.5 encontram-se representadas as aquisições dos sinais do sensor TEA para três injeções de padrões com diferentes gases, utilizando o peneiro molecular MS-5A na coluna de pré-concentração. A vermelho está representada uma injeção de um padrão com H_2S e vapor de água, a preto uma injeção de um padrão com CO_2 e vapor de água, e a azul uma injeção de um padrão com os três compostos, H_2S , CO_2 e vapor de água.

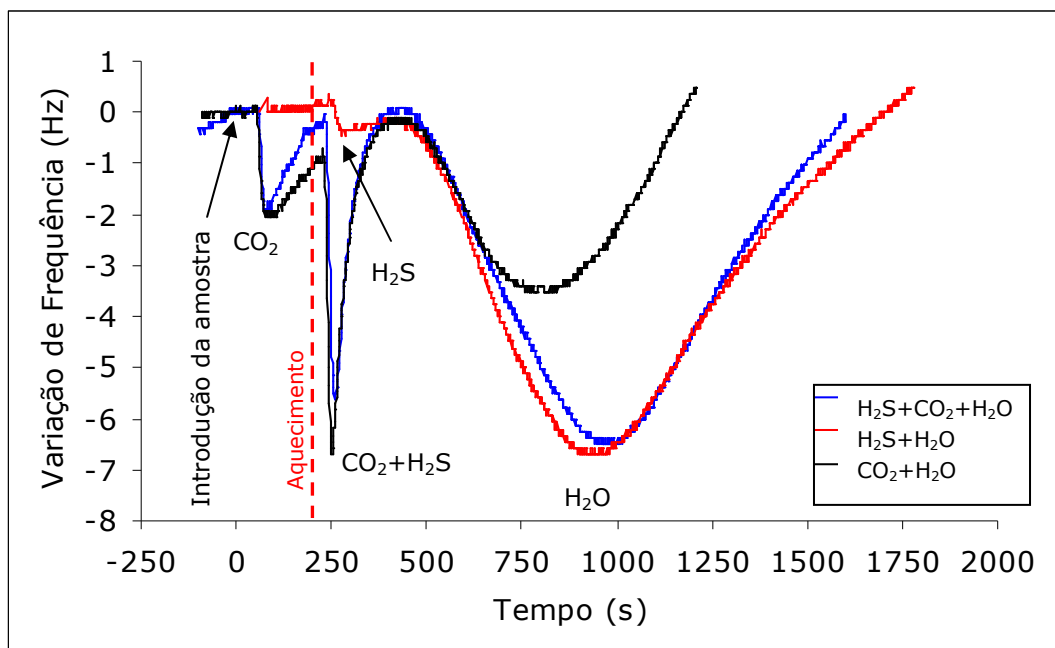


Figura 6.6 – Frequência do sensor TEA obtido para três injeções de padrões diferentes no sistema de análise acoplado a uma coluna de pré-concentração com o peneiro molecular MS-5A.

Como podemos observar, existem dois sinais de CO_2 , o primeiro corresponde a uma parte não adsorvida e o segundo sinal à parte adsorvida ao MS-5A e ocorre após o aquecimento da coluna para dessorção dos compostos concentrados. No padrão com H_2S e vapor de água, apenas se observaram dois sinais e ambos surgiram após o aquecimento da coluna. O primeiro corresponde ao H_2S , e ocorre alguns segundos após ligar o aquecimento, e o segundo sinal ocorre mais tarde e corresponde ao vapor de água. Como se pode observar o sinal do H_2S e do CO_2 ocorrem sensivelmente ao mesmo tempo, depois de ligar o forno. Este facto impediu a utilização do MS-5A como material adsorvente para distingui-los. De facto, com a injeção dos três compostos, representada a azul na figura 6.6, não se consegue distinguir o sinal mais pequeno do H_2S do sinal do CO_2 . Foi ainda construída uma coluna muito maior para acomodar todo o CO_2 , que mostrou ser ineficaz, pois era demasiado grande para as pequenas quantidades de H_2S , fazendo com que o sinal do H_2S ficasse tão largo que se deixava de distinguir. Portanto, a utilização do MS-5A como adsorvente

para a coluna de pré-concentração para a análise de H_2S em amostras de hálito não é recomendada.

O ETS4 é um outro tipo de peneiro molecular, é um titanossilicato, e parecia ser um bom candidato para a coluna de pré-concentração devido ao diâmetro de poro compatível com o H_2S e devido à sua fraca afinidade para o dióxido de carbono. No entanto, verificou-se que o H_2S reagiu com o ETS4 tornando impossível a sua quantificação. Supõe-se que o ETS4 terá funcionado como catalizador para uma reacção desconhecida. Verificou-se que o sinal do H_2S obtido após adsorção/dessorção pelo ETS4 é mais baixo do que quando se injecta directamente a amostra. De facto, verificou-se que quando se injectava uma amostra de H_2S com a coluna de ETS4 quente (200°C), o sinal do H_2S se mantinha nos mesmos níveis daquele que se obtinha na injeção directa, mas quando ficava adsorvido e após a dessorção a 200°C , o sinal do H_2S diminuía e observava-se mais tarde um segundo sinal de origem desconhecida.

Finalmente, foi testado o carvão activado que mostrou ser adequado para adsorver o H_2S nestas concentrações e apresentou uma baixa afinidade para o dióxido de carbono. Esta característica é uma grande vantagem uma vez que se elimina ou reduz significativamente um dos mais problemáticos compostos interferentes. Tornou-se assim possível injectar volumes de amostra maiores do que aqueles que eram possíveis na injeção directa. Porém, um volume maior de ar expirado também comporta maior quantidade de vapor de água e dióxido de carbono. Apesar da baixa selectividade do sensor TEA para estes compostos, a sua presença dificultou a implementação desta unidade de pré-concentração no sistema, uma vez que tivemos uma maior quantidade de interferentes para remover.

No caso da coluna de carvão activado, o dióxido de carbono deixa de ser um problema, uma vez que não é adsorvido e é eliminado durante o processo da injeção. Já no caso do vapor de água foi necessária a implementação de dispositivos de secagem em várias fases da análise, para remover a maior quantidade possível.

O vapor de água das amostras de ar expirado foi inicialmente capturado por condensação durante a amostragem do hálito para o saco, pelo tubo de aço-inox em forma de U refrigerado numa mistura frigorífica a -2°C . Foi também usada uma coluna com cloreto de cálcio anidro entre a porta de injeção e a coluna de pré-concentração e uma membrana de Nafion entre a coluna de pré-concentração e o sensor, para reduzir a quantidade de água da amostra. O cloreto de cálcio tinha sido referido na literatura como o melhor secante, sabendo-se que não ia causar qualquer efeito sobre os compostos de enxofre [15]. No entanto, a verdade é que o excesso de água adsorvido no cloreto de cálcio pode causar perdas de H_2S por dissolução nessa mesma água e por essa razão esta coluna foi trocada todos os dias. A adição da coluna de cloreto de cálcio anidro permitiu uma redução da quantidade de água pré-concentrada na coluna de carvão activado, melhorando desta forma a capacidade da coluna na adsorção do H_2S , uma vez que existe menos quantidade de água a ocupar espaços de adsorção no carvão activado. A membrana de Nafion encontra-se após a coluna de pré-concentração e antes do sensor, para eliminar o vapor de água que conseguiu passar pelos processos anteriores e que foi concentrado na coluna. A eficiência de secagem da membrana deve-se em grande medida à corrente de azoto que passa em contra-corrente no seu exterior.

Na figura 6.7 encontra-se representado um sinal de um padrão com os três compostos (H_2S , CO_2 e vapor de água) obtido no sistema de análise com o sensor TEA e a coluna de pré-concentração empacotada com carvão activado.

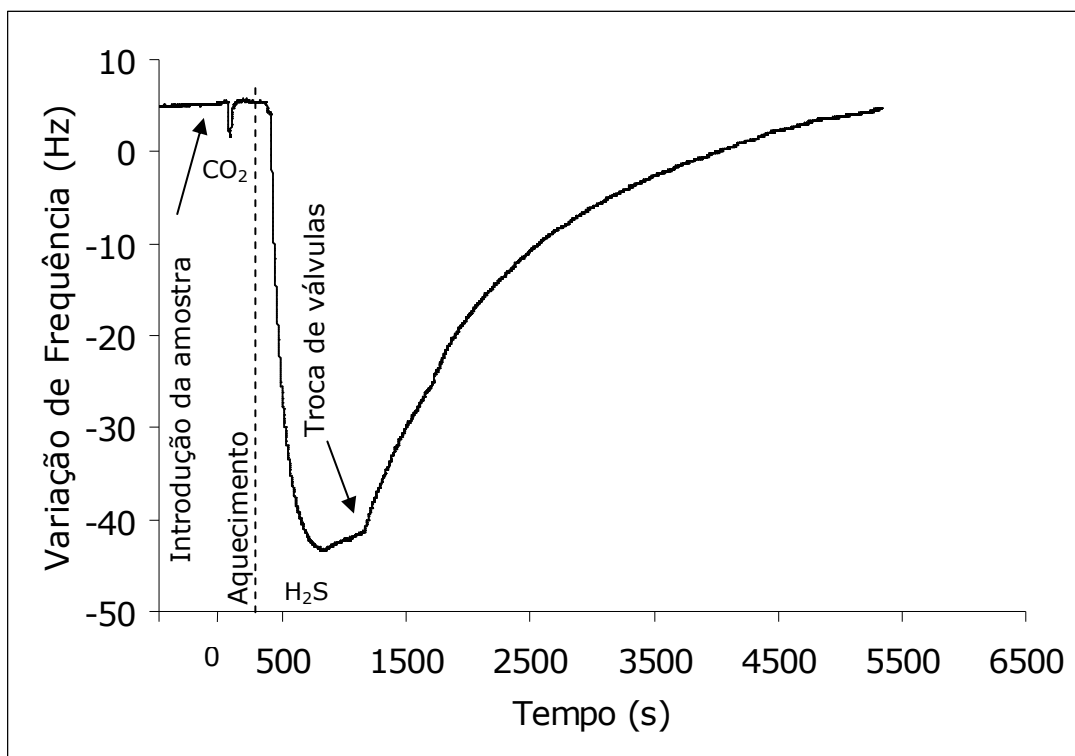


Figura 6.7 – Sinal obtido com o sistema de aquisição com membranas secantes de Nafion e coluna de carvão activado, para uma amostra contendo H₂S, CO₂ e vapor de água.

Na figura 6.7 podemos observar que o sinal do CO₂ ocorre antes de se ligar o forno e que alguns segundos após o aquecimento da coluna aparece o sinal do H₂S sem interferências do CO₂. Nesta figura observa-se uma “barriga” durante a recuperação do sinal de H₂S, que corresponde à troca das válvulas devido a diferenças de pressão. A troca de válvulas corresponde à troca representada na figura 6.3 c). O sinal do vapor de água que aparecia anteriormente no sistema, uns minutos após o sinal do H₂S, não se observa aqui nesta figura. Esta melhoria foi devida aos secantes introduzidos no sistema, nomeadamente a membrana de Nafion, a coluna de cloreto de cálcio anidro e à troca das válvulas, que permitiu eliminar o vapor de água.

Com esta unidade de pré-concentração foi possível injectar elevados volumes de amostra de hálito, o que possibilitou a detecção de H₂S em concentrações muito mais baixas. Foram obtidas com sucesso curvas de

calibração com declive de 85,6 Hz/ppm e um $r=0.993$, com padrões desde 162 ppb (v/v) a 1,08 ppm (v/v), injectando volumes de padrão com 400 mL. Obteve-se um limite de detecção com este sistema de 50 ppb (v/v) de H_2S , o que corresponde, para um volume de 400 mL, a uma massa de 28 ng de H_2S . Como era esperado, esta massa é muito semelhante ao limite de detecção conseguido sem pré-concentração, traduzindo-se a diferença entre as metodologias sem e com pré-concentração no volume muito maior onde essa massa de H_2S pode estar contida, permitindo detectar o H_2S nas concentrações baixas das amostras.

Como se viu anteriormente, o sensor também respondeu significativamente ao NH_3 , TMA, NO e NO_2 . Como tal, estes compostos foram injectados no sistema de análise com pré-concentração acima da concentração máxima encontrada no hálito humano, uma vez que também poderiam ser concentrados na coluna, interferindo assim na análise do H_2S . Nenhum destes compostos (NH_3 , TMA, NO e NO_2) afectou a análise do H_2S quando presentes no hálito em quantidades inferiores a 250 ppm de NH_3 , 0,35 $\mu g/100$ mL de TMA, 25ppm de NO e 25ppm de NO_2 . Desta forma, podemos dizer que a incorporação da coluna de pré-concentração de carvão activado mostrou ser eficiente para concentrar H_2S em amostras de ar expirado e na eliminação dos interferentes CO_2 , NH_3 , TMA, NO e NO_2 .

A tabela 6.3 mostra os resultados obtidos da análise com este sistema experimental ao hálito de diferentes pacientes e o respectivo diagnóstico clínico.

Tabela 6.3 – Resultados obtidos no sistema desenvolvido e o diagnóstico clínico dos pacientes.

Diagnóstico clínico dos pacientes	Concentração (H ₂ S ppb)	Em tratamento
Periodontite crónica localizada moderada	1625	sim
Periodontite crónica generalizada avançada	888	não
Periodontite crónica generalizada avançada	789	não
Gengivite grave	709	não
Periodontite crónica localizada moderada	576	sim
Periodontite crónica generalizada avançada	539	não
Periodontite crónica localizada moderada	502	sim
Periodontite crónica localizada moderada	435	sim
Periodontite crónica localizada moderada	373	não
Periodontite crónica generalizada avançada	337	sim
Periodontite crónica generalizada avançada	299	não
Cárie dentária com gengivite moderada	283	sim
Gengivite moderada	259	não
Periodontite crónica localizada moderada	252	sim
Periodontite crónica generalizada avançada, fumador	170	não

Saudável	255	-
Saudável	249	-
Saudável	243	-
Saudável	212	-
Saudável	201	-

Como se pode observar, existem diferenças significativas entre os sinais obtidos na análise do hálito dos pacientes saudáveis e os pacientes com doença periodontal. Através de um teste de comparação de médias obteve-se um $t_{\text{calculado}} = 3.177$, superior ao $t_{\text{tabelado}} (P=0.05, v=14) = 1.761$, o que nos indica que os resultados obtidos para os pacientes com doença periodontal são estatisticamente superiores aos resultados obtidos para os pacientes saudáveis.

Os pacientes saudáveis apresentaram valores de H_2S abaixo de 255 ppb, o que está de acordo com os valores encontrados na bibliografia (até 250 ppb para pacientes saudáveis [6]). Os pacientes com doença periodontal mostraram valores de H_2S superiores aos saudáveis. Apenas dois pacientes referidos como portadores de doença periodontal mostraram ter baixas concentrações de H_2S , não tendo um deles seguido o protocolo de conduta para a recolha das amostras, tendo fumado precisamente antes da consulta.

A concentração de H_2S obtida em pacientes com doença periodontal estava entre 170 a 1625 ppb (v/v) e não foi possível explicar os resultados obtidos com os diferentes problemas diagnosticados para cada paciente. Outros investigadores [17-19] também não encontraram relação entre a prevalência ou severidade da halitose com a doença periodontal. Entre as possíveis explicações está o facto da placa bacteriana nos dentes, amígdalas e língua não ter sido avaliada nestes pacientes e poder ser a causa das variações da halitose entre os pacientes. Além disso, o ar expirado recolhido era de origem oral, mas também pulmonar, podendo o odor não ter origem apenas em problemas periodontais. A dieta dos pacientes também diferiu entre eles e pode influenciar o hálito, especialmente em dietas ricas em proteína.

Apesar de tudo isto, esta nova metodologia pode ser usada como um método rápido e preciso para detectar o H_2S no hálito, e não há dúvida de que este composto é um indicador de um problema de saúde que deve ser investigado.

6.5. Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema analítico não dispendioso para determinar a concentração de H₂S em amostras de hálito. Foi possível distinguir pacientes saudáveis de pacientes com doença periodontal, com base na concentração de H₂S encontrada no hálito de cada um. Este sistema foi avaliado com possíveis interferentes e permitiu uma análise ao H₂S no ar expirado adequada e robusta aos interferentes. As análises ao ar expirado são indolores e não-invasivas para o paciente, podendo-se assumir num futuro próximo um papel importante como ferramenta no diagnóstico clínico.

6.6. Referências

- [1] A. Tangerman, Int. Dent. J., 52 (2002) 201.
- [2] M. Phillips, Disease markers in exhaled breath - Detection of volatile organic compounds in breath, pp 219-231. eds Marczin N, Kharitonov SA, Yacoub MH and Barnes PJ. Marcel Dekker, New York, 2002.
- [3] A. Amann, A. Schmid, S. Scholl-Burgi, S. Telser, H. Hinterhuber, Spectroscopy-Europe, 17 (2005) 18.
- [4] K. Yaegaki, K. Sanada, J. Periodontol., 63 (1992) 783.
- [5] P. Ratcliff, P. Johnson, J. Periodontol., 70 (1999) 485.
- [6] J. Rodríguez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Spectroscopy-Europe, 14 (2002) 6.
- [7] M. Sanz, S. Roldán, D. Herrera, J. Contemp. Dent. Pract., 2 (2001) 1.
- [8] M. Morita, L.H. Wang, (a review) J. Clin. Periodontol., 28 (2001) 813.
- [9] K. Yaegaki, J.M. Coil, (a review) J. Can. Dent. Assoc., 66 (2000) 257.
- [10] J. Furne, G. Majerus, P. Lenton, J. Springfield, D. Levitt, M. Levitt, J. Dent. Res., 81 (2002) 140.
- [11] S.S. Lee, W. Zhang, Y. Li, CDA Journal, 35 (2007) 259.

- [12] M. Phillips, Sci. Am., 267(1992) 74.
- [13] M.T.S.R. Gomes, P. Sérgio, T. Nogueira, J.A.B.P. Oliveira, Sensor. Act. B, 68 (2000) 218.
- [14] G. H. Jeffery, J. Bassett, J. Mendham, R. C. Denney, Análise Química Quantitativa – Vogel, Guanabara Koogan, Rio d Janeiro, Brasil (1992).
- [15] A. Tangerman, J. Chromatogr., 366 (1986) 205.
- [16] M. Black, R. Herbst, D. Hitchcock, Anal. Chem., 50 (1978) 848.
- [17] A. Bosy, GV. Kulkarni, M. Rosenberg, CA. McCulloch, J. Periodontol., 65 (1994) 37.
- [18] M. Morita, HL. Wang, J. Periodontol., 72 (2001) 79.
- [19] LC. Figueiredo, EP. Rosetti, E. Marcantonio, RAC. Marcantonio, SL. Salvador, J. Periodontol., 73 (2002) 1338.

7. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

7. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

Neste trabalho foi desenvolvido um novo sistema experimental baseado em sensores piezoeléctricos para análise de gases, com células de PVC de volume interno reduzido, com novos osciladores e um software que permite a aquisição da frequência até à décima do Hertz para oito sensores em simultâneo, em intervalos de um segundo. Apesar de estarmos a aumentar a complexidade do sistema de aquisição com o circuito divisor e o programa de aquisição, estes mostraram ser fundamentais para o desenvolvimento dos sensores individuais, permitindo a análise de compostos no ar em concentrações ambientais, e para o desenvolvimento de uma bateria de sensores necessária para um nariz electrónico. Este novo sistema aumentou a sensibilidade cerca de 100 vezes em relação ao sistema antigo com células de vidro.

Foram testados vários sensores com revestimentos sensíveis a diversos gases para serem utilizados na bateria de sensores do nariz electrónico. Esta bateria de sensores, associada a um sistema de reconhecimento de padrões, baseado em redes neuronais artificiais, permitiu uma rápida e correcta identificação e quantificação dos dez compostos nocivos testados (amónia, propanona, hexano, ácido acético, tolueno, metanol, tetraclorometano, clorofórmio, etanol e diclorometano). Este trabalho mostrou a possibilidade da aplicação do nariz electrónico

como sistema de alarme em armazéns com elevado risco de libertação de contaminantes químicos, por derrame ou outras causas acidentais, permitindo assim uma maior eficácia da fase de limpeza com os meios de segurança adequados.

A aplicação de uma análise de componentes principais antes do treino das redes neuronais tornou a aprendizagem mais eficiente e rápida e a rede mais simples. A junção da bateria de sensores e redes neuronais artificiais permitiu, com um pequeno conjunto de sensores, identificar e quantificar um maior número de compostos nocivos (dez) relativamente ao número de sensores (seis).

O nariz electrónico, com um conjunto de sensores um pouco diferente do anterior, foi também aplicado com sucesso na classificação de algumas variedades de frutas em comestíveis e estragadas. Mostrou-se que a classificação das frutas como comestíveis ou estragadas foi alcançada com 95% de sucesso, com apenas dois sensores (Nafion e Tenax), para o conjunto de todas as variedades de fruta usadas no estudo (maças Starking, peras William, maçãs Golden, laranjas New Hall e Kiwis).

Este método de análise não destrutivo oferece, portanto, vantagens consideráveis na avaliação da fruta em relação aos métodos destrutivos usuais. Ficou ainda demonstrada a possibilidade do nariz electrónico, composto com apenas dois sensores e com um sistema de classificação simples, ser aplicado numa despensa, para alertar da presença de fruta estragada.

Neste trabalho foi ainda desenvolvido um sistema analítico, com apenas um sensor, para determinar a concentração de H_2S em amostras de hálito. Uma das maiores dificuldades deste trabalho foi atingir os limites de detecção muitíssimo baixos exigidos para a detecção do H_2S nas amostras extremamente complexas de hálito, com grandes quantidades de vapor de água e de dióxido de carbono. A introdução de uma coluna de pré-concentração, em conjunto com sistemas para captura do vapor de água,

permitiu uma análise do H_2S no ar expirado adequada e robusta aos interferentes. Foi possível determinar a concentração de H_2S no hálito dos pacientes com um limite de detecção de 50 ppb de H_2S e distinguir pacientes saudáveis de pacientes com doença periodontal. Esta análise mostrou que o sistema desenvolvido pode vir a ser uma poderosa ferramenta no diagnóstico clínico, com a vantagem de ser indolor e não-invasiva.

Como trabalho futuro, seria de todo o interesse desenvolver um sistema de análise semelhante ao proposto para o H_2S , para ser aplicado na análise de outros compostos do ar expirado. Seria então possível construir um nariz electrónico capaz de identificar um conjunto de compostos no ar expirado, relacionados com certas doenças, para ser utilizado na avaliação do estado de saúde do paciente.

As capacidades analíticas demonstradas pelo nariz electrónico para análise de gases e particularmente de misturas complexas, permite vislumbrar uma grande quantidade de aplicações para analisar amostras de ar de diferente natureza. Um exemplo de aplicação do nariz electrónico seria o seu uso como sistema de análise para a identificação e quantificação dos compostos odoríficos em ETARs ou aterros sanitários (como indicador dos processos químicos ou biológicos em decurso), bem como para análises não destrutivas de outros alimentos como carnes, peixes, lacticínios e bebidas.

ANEXOS

ANEXOS A

Tabela A1 – Matriz com os resultados obtidos no sistema experimental (frequência, Hz) que foi usada no grupo de treino para a construção das redes neuronais artificiais do capítulo 3.

Composto	Sinal dos Sensores (Hz)						Massa (µg)
	Dithiol	Nafion	Mn_pht	PDMS	TMAF	Mg_pht	
Amónia	0.8	25.1	4	2.5	9	9.3	2.1
	0.4	15.3	2.3	1.2	5.8	6.2	1.1
	2.7	99.2	10.9	6.2	23.9	17.8	10.7
	1.4	54.7	7	3.7	16.7	12.9	5.3
Acetona	3.2	28.3	8.3	5.9	1.2	3	30.3
	1.2	12.3	4.1	2.3	1.7	1.5	12.1
	11	70.6	23.8	19.6	4.3	7.2	90.9
	5.9	37.3	12.1	9.1	3	4	42.4
	14.3	86.1	29.5	25.7	2.6	7.2	121.3
Hexano	6.1	2.4	5.4	14.4	1.3	1.2	31.1
	12.8	4.4	11	30.3	1.6	2.4	62.2
	19.5	5.7	17	46.4	1.8	4.1	93.3
	26.1	6.5	22.2	62.5	0.8	4.7	124.4
Ácido acético	0.4	4.2	0.4	0	1.8	1.8	1.9
	0.4	11	0.7	0	5	3.9	5.6
	0	8.1	0.5	0	4.3	3.2	3.7
	0.3	11.3	1	0	6	3.9	5.6
	0	6.6	0.7	0	3.6	2.6	2.6
	0.6	15	1.4	0	7.7	5.7	7.5
	0.2	5.1	0.6	0	3.4	1.6	1.9

	0	8.4	0.8	0	5	2	3.7
	0.5	13.5	0.9	0	7.6	2.9	5.6
	0.5	7.8	0.8	0	4.3	1.8	2.6
	0.4	18.2	1.6	0	9.5	4.4	7.5
	0.2	6.2	0.7	0	3.1	1.4	1.9
Tolueno	3.7	2.4	4.9	4	0.8	0.7	5.5
	6.8	4.1	8	7.5	1	1.8	11.0
	18.7	8.7	21.9	21.6	3	4.8	27.4
	16	7.4	18.5	18.1	2.8	4.5	21.9
Metanol	1.1	31.4	5.1	0.9	8.5	5.7	8.6
	2.7	88	13.9	2.7	21.3	14.9	25.7
	0.5	13.9	2.2	0.5	3.7	2.4	3.4
	1.7	59.6	9.5	2	14.5	10.1	17.1
	1.1	35.2	6.1	1.3	14.8	5.1	8.6
	0.4	13.2	2.5	0.5	5.7	2.3	3.4
	1.7	66.3	11.4	2.1	27.2	9.3	17.1
	1.2	36.9	6.9	1.2	15.8	5.2	8.6
	1.3	47.2	8.6	1.6	19	7.3	12.0
	2.7	97.5	18	3.4	38.5	14.9	25.7
	3.8	143.2	24	4.6	55.9	20.9	34.2
Tetraclorometano	14.3	4	18.4	27.5	3.3	2.9	38.4
	19.3	4.4	24.2	37.2	3.8	3.5	53.8
	29	7.4	37	55.9	7	5.4	76.8
	57.3	11.9	73	114.9	12.2	9.5	153.6
	17.1	6.1	20.5	34.3	4.5	3.2	38.4
	34.2	8.2	39.1	66.2	7.1	5.1	76.8
	23	8.3	26.9	44.8	6.3	4.4	53.8
	51.9	10.9	58	101.1	10	7.9	115.2
	69.6	11.3	80.5	141.4	11.3	9.9	153.6
Clorofórmio	18.5	5.8	34.4	21	2.4	6.4	52.2
	35.3	9.5	64.6	41.1	4.8	11.8	104.5
	6.5	2.3	13.8	9.2	1	2.5	20.9
	52.4	12.9	94.4	62.5	7.2	18.3	156.7
	21.9	7.1	40.2	25.5	5.1	6.7	52.2
	42.1	9.3	74.3	49.3	8.5	11.8	104.5
	28.8	7.4	53.9	33.8	5.6	8.5	73.1
	62	13.7	108.2	74.5	11.4	18.3	156.7
	80.7	17.9	139.5	100.1	15.5	23.4	209.0
Etanol	1.3	15	5.8	1.5	5	2.3	5.2
	1.9	20.1	7.9	2	6.6	4.2	7.3
	0.7	5.4	2.3	0.5	1.7	1.3	2.1
	4.6	55.7	19.5	6	16.7	11.8	20.7
	3.4	42.6	15.2	4.6	13	8.6	15.6
	1.3	18.6	6.5	1.7	7.7	3.6	5.2
	0.5	9.3	3.2	0.9	3.4	2.2	2.1

	2.4	38.1	12.6	3.7	14.3	6.8	10.4
	1.6	27.9	9.7	2.7	10.8	4.8	7.3
	3.5	58	19.6	5.8	22	10.6	15.6
	5.1	77.7	24.6	7.9	27.8	13.7	20.7
Diclorometano	13	6.4	25.2	14.2	1.2	4.2	81.1
	18.6	7.6	34.6	19.9	0.9	6.9	113.5
	4.9	2.7	10.4	5.5	0.4	2	32.4
	39.7	18.6	69.5	43.5	2.8	15.3	243.2
	52.5	24.5	87.8	57.6	3.5	19.8	324.2
	16	7.6	31.5	16.7	2.2	5.2	81.1
	6.1	3.7	13.6	6.5	1.1	2.7	32.4
	28.7	12.9	56.4	31.6	3.5	9.3	162.1
	20.6	9.9	41.3	22.5	2.7	7.1	113.5
	43.2	19.5	78.7	47.9	4.6	14.3	243.2
	58	24.8	103.3	64.3	6.2	18.6	324.2

Tabela A2 – Matriz com os resultados obtidos no sistema experimental (frequência, Hz) que foi usada no grupo de controlo para a construção das redes neuronais artificiais do capítulo 3.

Composto	Massa (μg)	Sinal dos Sensores (Hz)					
		Dithiol	Nafion	Mn_pht	PDMS	TMAF	Mg_pht
Amónia	2.1	0.9	24.6	3.9	2.1	8.7	8.9
Acetona	42.4	5.3	39	12	8.7	4	4.2
Hexano	31.1	6.7	2.4	5.4	15.4	0.4	1.5
Ác. acético	7.5	0.4	14.9	1.4	0.2	7.4	6
Tolueno	21.9	16	7.4	18.5	18.1	2.8	4.5
Metanol	1.4	1.2	43	7.2	1.3	10.9	7
Tetraclorometano	76.8	29.3	6.5	37	56.8	5.9	5.6
Cloroformio	104.5	35.3	9.5	64.6	41.1	4.8	11.8
Etanol	5.2	1.3	14.9	5.4	1.6	4.3	3.4
Diclorometano	81.1	13	6.6	25	14	0.7	5.3

Tabela A3 – Matriz com os resultados obtidos no sistema experimental (frequência, Hz) que foi usada no grupo de teste para a construção das redes neuronais artificiais do capítulo 3.

Composto	Massa (μg)	Sinal dos Sensores (Hz)					
		Dithiol	Nafion	Mn_pht	PDMS	TMAF	Mg_pht
Amónia	7.5	2.5	73.7	9.4	5.3	19.7	16.4
Acetona	60.6	7.6	49.4	16.9	13	3	4.5
Hexano	43.6	8.8	4.6	7.5	20.8	2	2.3
Ác. Acético	1.9	0	4.5	0.3	0	2.7	2.1
Tolueno	16.4	10.6	5.6	12	11.8	1.9	2.8
Ác. Acético	1.4	0.3	5.5	0.7	0	2.2	2.2
Tetraclorometano	115.2	44.7	9.4	56.4	88.4	9	7.7
Clorofórmio	73.1	24.7	7.3	46.9	29	3.7	8.6
Etanol	10.4	2.7	30.5	11.5	3.1	8.4	6.2
Diclorometano	162.1	26.3	12	47.7	28.5	1.9	9.4